

# Die alkaline Phosphataseaktivität – ein Indikator für den Phosphorstatus in Phytoplanktongemeinschaften?

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

**Universität  
Rostock**



Traditio et Innovatio

vorgelegt von

Diplom-Biologin Iris Schaub

geboren am 11.02.1985 in Rastatt

Rostock, den 14.01.2021

**Gutachter:**

1. Gutachter:

Prof. Dr. Ulf Karsten

Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Hans-Peter Grossart

Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Berlin

**Datum der Einreichung:** 14.01.2021

**Datum der Verteidigung:** 26.03.2021

„Wir müssen Ausdauer und vor allem Vertrauen in uns selbst haben.  
Wir müssen glauben, dass wir begabt sind und dass wir etwas erreichen können.“

**Marie Curie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungen für chemische und biochemische Substanzen .....</b>	<b>XII</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Summary .....</b>	<b>XV</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Phosphor im biogeochemischen Kreislauf der Gewässer .....	1
1.2 Die alkaline Phosphataseaktivität als Indikator für den Phosphorstatus einer Phytoplanktongemeinschaft .....	7
1.3 Fragestellung .....	9
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Untersuchungsgebiete .....	11
2.2 Probenahme .....	14
2.3 Bestimmung der abiotischen Parameter .....	15
2.3.1 Temperatur, pH-Wert und Salinität.....	15
2.3.2 Nährstoffe.....	15
2.4 Bestimmung der biotischen Parameter .....	16
2.4.1 Chlorophyll <i>a</i> -Gehalt.....	16
2.4.2 Bakterienabundanz .....	17
2.4.3 Seston .....	18
2.4.4 Partikuläres organisches Material .....	18
2.4.5 Partikulärer organischer Kohlenstoff und partikulärer Stickstoff .....	19
2.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten .....	19
2.5.1 Alkaline Phosphataseaktivität .....	19
2.5.2 Aminopeptidaseaktivität.....	24
2.6 Nährstoffexperimente mit natürlichen Zingster Strom-Planktonproben.....	25
2.7 Qualitätssicherung.....	26
2.8 Statistik.....	27

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1 Die drei untersuchten Gewässer im Vergleich .....	28
3.1.1 Allgemeine Merkmale .....	28
3.1.2 Die größenfraktionierte alkaline Phosphatase- und Amino-peptidaseaktivität .....	31
3.1.3 Die Michaeliskonstanten der einzelnen Größenfraktionen .....	33
3.1.4 Die drei untersuchten Gewässer im Jahresgang .....	37
3.2 Die Interpretation der alkalinen Phosphataseaktivität .....	43
3.2.1 Der Einfluss des Normierungsparameters .....	43
3.2.2 Die alkaline Phosphataseaktivität im Vergleich mit anderen Phosphorlimitationsindikatoren .....	47
3.3 Die Reaktion der alkalinen Phosphataseaktivität auf verschiedene Nährstoffzugaben .....	53
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>60</b>
4.1 Methodische Betrachtungen .....	60
4.1.1 Die Nomenklatur der Phosphorfraktionen .....	60
4.1.2 Die Messung der alkalinen Phosphataseaktivität .....	60
4.2 Die Eignung der gelösten alkalinen Phosphataseaktivität als Indikator einer Phosphorlimitation .....	69
4.3 Die Eignung der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität als Indikator einer Phosphorlimitation .....	71
4.3.1 Die Wahl des Normierungsparameters und dessen Einfluss auf die Interpretation der alkalinen Phosphataseaktivität .....	74
4.3.2 Die Nutzung von Grenzwerten zur Interpretation der alkalinen Phosphataseaktivität .....	77
4.3.3 Der Vergleich der alkalinen Phosphataseaktivität mit anderen P-Limitationsindikatoren .....	81
4.4 Die Eignung der Michaeliskonstante als Indikator einer Phosphorlimitation .....	89
<b>5. Schlussfolgerung .....</b>	<b>91</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>95</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>111</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>139</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>140</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>141</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>142</b>
<b>Fachvorträge und Posterpräsentationen .....</b>	<b>143</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Biogeochemischen Nährstoffkreisläufe im Meer.....	2
Abbildung 1.2: Die enzymatische Spaltung einer Phosphomonoesterbindung durch eine Phosphomonoesterase.....	6
Abbildung 2.1: Die Ostseeküste von Mecklenburg-Vorpommern (a) mit den beprobten Standorten Ostsee (b) Warnow (c) und Zingster Strom.....	13
Abbildung 2.2: Der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit der alkalinen Phosphataseaktivität mit steigender Substratkonzentration.....	20
Abbildung 2.3: Die Darstellung der theoretischen Reaktionsgeschwindigkeit der alkalinen Phosphataseaktivität, berechnet mit der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeit, der Michaelis-Menten-Gleichung und der KQ-Methode.....	23
Abbildung 3.1: Der prozentuelle Anteil von verschiedenen Größenklassen an der gesamten alkalinen Phosphataseaktivität in der a) Ostsee, b) Warnow und c) Zingster Strom zu verschiedenen Zeitpunkten.....	32
Abbildung 3.2: Der prozentuelle Anteil von verschiedenen Größenklassen an der gesamten Amino-peptidaseaktivität der Ostsee, Warnow und Zingster Strom im Frühjahr 2017.....	33
Abbildung 3.3: Die theoretischen Reaktionsgeschwindigkeiten mit den Michaeliskonstanten der alkalinen Phosphataseaktivität für die einzelnen Filtrate und der Vollprobe am Beispiel einer Warnowprobe vom 13.03.2017.....	34
Abbildung 3.4: Die Michaeliskonstanten der Filtrate und der Vollprobe aller größenfraktionierten alkalinen Phosphataseaktivitäts-Messungen der Ostsee, Warnow und des Zingster Stroms.....	34
Abbildung 3.5: Die kalkulierten Reaktionsgeschwindigkeiten mit den theoretischen Michaelis-Menten-Kurven der alkalinen Phosphataseaktivität in a) der Vollprobe, b) dem 50 µm Filtrat und c) der > 50 µm Größenfraktion am Beispiel einer Warnowprobe vom 13.03.2017.....	35
Abbildung 3.6: Die Michaeliskonstanten der alkalinen Phosphataseaktivität der Vollprobe und der gelösten bzw. partikulären Fraktion im Verlauf des Jahres 2016 am Beispiel des Zingster Stroms.....	37

Abbildung 3.7: Die abiotischen und biotischen Parameter der Ostsee im Verlauf des Jahres 2016; a) Chlorophyll <i>a</i> -Gehalt und Bakterienabundanz; b) gelöster anorganischer Phosphorgehalt und Stickstoffgehalt; c) partikuläre alkaline Phosphataseaktivität normiert über den partikulären Phosphorgehalt und partikuläre Aminopeptidaseaktivität normiert über die Bakterienabundanz.....	40
Abbildung 3.8: Die abiotischen und biotischen Parameter der Warnow im Verlauf des Jahres 2016; a) Chlorophyll <i>a</i> -Gehalt und Bakterienabundanz; b) gelöster anorganischer Phosphorgehalt und Stickstoffgehalt; c) partikuläre alkaline Phosphataseaktivität normiert über den partikulären Phosphorgehalt und partikuläre Aminopeptidaseaktivität normiert über die Bakterienabundanz.....	41
Abbildung 3.9: Die abiotischen und biotischen Parameter des Zingster Stroms im Verlauf des Jahres 2016; a) Chlorophyll <i>a</i> -Gehalt und Bakterienabundanz; b) gelöster anorganischer Phosphorgehalt und Stickstoffgehalt; c) partikuläre alkaline Phosphataseaktivität normiert über den partikulären Phosphorgehalt und partikuläre Aminopeptidaseaktivität normiert über die Bakterienabundanz.....	42
Abbildung 3.10: Die partikuläre alkaline Phosphataseaktivität aller drei Gewässer im Jahresverlauf normiert über a) das partikuläre organische Material, b) über den Chlorophyll <i>a</i> -Gehalt und c) über die partikuläre Aminopeptidaseaktivität.....	45
Abbildung 3.11: Die partikuläre alkaline Phosphataseaktivität der drei Gewässer normiert über den partikulären Phosphorgehalt gegenüber a) dem gelösten anorganischen Phosphorgehalt, b) dem PN:PP-Verhältnis und c) dem PP:POM-Verhältnis.....	49
Abbildung 3.12: Die Michaeliskonstante der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität der drei Gewässer gegenüber a) dem gelösten anorganischen Phosphorgehalt, b) dem PN:PP-Verhältnis und c) dem PP:POM-Verhältnis.....	50
Abbildung 3.13: Abb. 3.13: Die Entwicklung des gelösten anorganischen Stickstoff zu Phosphorverhältnisses in natürlichen Zingster Strom-Proben mit der Zugabe von a) Phosphat, b) Nitrat, c) Phosphat und Nitrat im Verhältnis von 15:1, d) Phosphat und Nitrat im Verhältnis von 4:1 und e) ohne Nährstoffzugabe.....	56
Abbildung 3.14: Die Veränderung der alkalinen Phosphataseaktivität normiert durch die Aminopeptidaseaktivität in natürlichen Zingster Strom-Proben mit der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen nach 24 Stunden und nach sieben Tage.....	58

Abbildung 3.15: Die Veränderung der Michaeliskonstante der alkalinen Phosphataseaktivität in natürlichen Zingster Strom-Proben mit der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen nach 24 Stunden und nach sieben Tage.....	59
Abbildung A1: Blindwert-Zielkarte für die Messung des gelösten anorganischen Phosphorgehalts.....	111
Abbildung A2: Blindwert-Zielkarte der Messung des Gesamtphosphorgehalts und des gelösten Phosphorgehalts.....	111
Abbildung A3: Blindwert-Zielkarte der Messungen des Ammonium-, Nitrit- und Nitratgehalts.....	112
Abbildung A4: Blindwert-Zielkarte der Messung der alkalinen Phosphataseaktivität.....	112
Abbildung A5: Blindwert-Zielkarte der Messung der Aminopeptidaseaktivität.....	113
Abbildung A6: Sollwert-Zielkarte des Standards Kaliumhydrogenphosphat für die Messung des gelösten anorganischen Phosphorgehalts.....	113
Abbildung A7: Sollwert-Zielkarte des Standards Diphenylphosphat der Messung des Gesamtphosphorgehalts und des gelösten Phosphorgehalts.....	114
Abbildung A8: Sollwert-Zielkarte der Standards Ammoniumchlorid und Natriumnitrit in verschiedenen Konzentrationen für die Messungen des Ammonium-, Nitrit- und Nitratgehalts.....	114
Abbildung A9: Regelkarte für die Kalibrierfaktoren der Messung des Substrats Methylumbelliferon.....	115
Abbildung A10: Regelkarte für die Kalibrierfaktoren der Messung des Substrats 7-Amino-4-methylcumarin.....	115
Abbildung A11: Spannweiten-Regelkarte für die Messung des gelösten anorganischen Phosphorgehalts.....	116
Abbildung A12: Spannweiten-Regelkarte der Messung des Gesamtphosphorgehalts und des gelösten Phosphorgehalts.....	116
Abbildung A13: Spannweiten-Regelkarte der Messung des Ammoniumgehalts.....	117
Abbildung A14: Spannweiten-Regelkarte der Messung des Nitritgehalts.....	117



Abbildung A15: Spannweiten-Regelkarte der Messung des Nitratgehalts.....	118
Abbildung A16: Spannweiten-Regelkarte der Messung der alkalinen Phosphataseaktivität....	118
Abbildung A17: Spannweiten-Regelkarte der Messung der Amino-peptidaseaktivität.....	119
Abbildung A18: Spannweiten-Regelkarte der Messung des Chlorophyll <i>a</i> -Gehalts.....	119
Abbildung A19: Spannweiten-Regelkarte der Messung des Sestongehalts.....	120
Abbildung A20: Spannweiten-Regelkarte der Messung des Gehalts an partikulärem organischem Material.....	120
Abbildung A21: Spannweiten-Regelkarte der Messung des partikulären organischen Kohlenstoffgehalts.....	121
Abbildung A22: Spannweiten-Regelkarte der Messung des partikulären Stickstoffgehalts....	121
Abbildung A23: Die Veränderung des partikulären organischen Kohlenstoffgehalts in natürlichen Zingster Strom-Proben nach der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen, angegeben in Prozent vom Ausgangswert nach 24 Stunden und nach sieben Tagen.....	122
Abbildung A24: Die Veränderung des Chlorophyll <i>a</i> -Gehalts in natürlichen Zingster Strom-Proben nach der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen, angegeben in Prozent vom Ausgangswert nach 24 Stunden und nach sieben Tagen.....	123
Abbildung A25: Die Veränderung des Chlorophyll <i>a</i> zu Seston-Verhältnisses in natürlichen Zingster Strom-Proben vor und nach der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen....	124
Abbildung A26: Die Entwicklung des gelösten anorganischen Phosphorgehalts in natürlichen Zingster Strom-Proben nach der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen.....	125
Abbildung A27: Die Entwicklung des gelösten anorganischen Stickstoffgehalts in natürlichen Zingster Strom-Proben nach der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen.....	126
Abbildung A28: Die Veränderung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit), unterteilt in den gelösten und partikulären Anteil, und der Michaeliskonstante der alkalinen Phosphataseaktivität mit einer Änderung der a) Temperatur und b) des pH-Wertes.....	127

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Die Bestandteile des gelösten Phosphors im Gewässer, unterteilt in gelöste anorganische und gelöste organische Phosphorverbindungen, sowie die spezifischen Enzyme für deren Phosphatabspaltung.....	4
Tabelle 2.1: Die Charakteristiken der drei untersuchten Gewässer in Bezug auf Gewässertyp, Salinität und Trophiestatus.....	11
Tabelle 3.1: Die abiotischen und biotischen Parameter der drei untersuchten Gewässer im Vergleich; angegeben als Median; Minimum bis Maximum.....	30
Tabelle 3.2: Die Michaeliskonstanten der alkalinen Phosphataseaktivität der verschiedenen Größenfraktionen und der Vollprobe der Ostsee, Warnow und Zingster Strom zu verschiedenen Messzeitpunkten.....	36
Tabelle 3.3: Die verschiedenen Phosphorlimitationsindikatoren im Vergleich für die Ostsee, die Warnow und den Zingster Strom zu den verschiedenen Jahreszeiten.....	46
Tabelle 3.4: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität, unterschiedlich normiert, und verschiedenen Phosphorlimitationsindikatoren von allen drei Gewässern.....	51
Tabelle 3.5: Die Reaktion der alkalinen Phosphataseaktivität des Zingster Stroms und des DIN:DIP-Verhältnisses auf die Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen nach sieben Tagen.....	57
Tabelle 4.1: Der Vergleich der Michaeliskonstante der alkalinen Phosphataseaktivität zwischen verschiedenen Organismen und Gewässern.....	65
Tabelle 4.2: Der Vergleich der alkalinen Phosphataseaktivität zwischen verschiedenen Gewässern, unterteilt nach ihrem Trophiestatus.....	72
Tabelle 4.3: Die Hemmung der alkalinen Phosphataseaktivität nach Zugaben von Phosphat, im Vergleich zwischen verschiedenen Studien.....	87
Tabelle A1: Die verschiedenen Indikatorparameter zur Identifizierung von Mangelsituationen für die Nährstoffe Phosphor und Stickstoff.....	128
Tabelle A2: Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Nährstoffkonzentrationen und die Enzymaktivitäten.....	129

Tabelle A3: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen verschiedenen Biomasseparametern an den drei untersuchten Standorten.....	130
Tabelle A4: Ergebnisse des Kruskal-Wallis Test bei unabhängigen Stichproben zum Testen von Unterschieden in der alkalinen Phosphataseaktivität und Aminopeptidaseaktivität zwischen den drei untersuchten Gewässern.....	131
Tabelle A5: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität und verschiedenen Biomasseparametern an den drei untersuchten Standorten...	132
Tabelle A6: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären Aminopeptidaseaktivität und verschiedenen Biomasseparametern an den drei untersuchten Standorten.....	133
Tabelle A7: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität, unterschiedlich normiert, und verschiedenen Phosphorlimitationsindikatoren am Standort Ostsee.....	134
Tabelle A8: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität, unterschiedlich normiert, und verschiedenen Phosphorlimitationsindikatoren am Standort Warnow.....	135
Tabelle A9: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität, unterschiedlich normiert, und verschiedenen Phosphorlimitationsindikatoren am Standort Zingster Strom.....	136
Tabelle A10: Ergebnisse des T-Test bei gepaarten Stichproben zum Testen von Unterschieden in der Änderung der alkalinen Phosphataseaktivität nach 24 Stunden und sieben Tagen zwischen den Nährstoffbehandlungen.....	137

## Abkürzungsverzeichnis

AlkPA	Alkaline Phosphataseaktivität
AcidPA	Saure Phosphataseaktivität
AcidP <sub>ase</sub>	Saure Phosphomonoesterase
AlkP <sub>ase</sub>	Alkaline Phosphomonoesterase
C	Kohlenstoff
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
DIC	Gelöster anorganischer Kohlenstoff
DIN	Gelöster anorganischer Stickstoff
DIP	Gelöster anorganischer Phosphor
DM	Trockenmasse
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff
DOM	Gelöstes organisches Material
DON	Gelöster organischer Stickstoff
DOP	Gelöster organischer Phosphor
DP	Gelöster Phosphor
K <sub>M</sub>	Michaeliskonstante
N	Stickstoff
P	Phosphor
Partik.	Partikulär
Pep <sub>ase</sub>	Aminopeptidase
PepA	Aminopeptidaseaktivität
POC	Partikulärer organischer Kohlenstoff
POM	Partikuläres organisches Material
POP	Partikulärer organischer Phosphor
PN	Partikulärer Stickstoff
PP	Partikulärer Phosphor
TP	Gesamtphosphor
V	Reaktionsgeschwindigkeit
V <sub>Kalk</sub>	Kalkulierte Reaktionsgeschwindigkeit
V <sub>Theor</sub>	Theoretische Reaktionsgeschwindigkeit
V <sub>max</sub>	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit

## Abkürzungen für chemische und biochemische Substanzen

AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
DiFMUF-P	6,8- Difluoro-4-Methylumbelliferyl-Phosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELF®97	Enzymmarkierendes Fluoreszenz-Produkt®97
ELF®97-P	Enzymmarkierendes Fluoreszenz-Substrat®97-Phosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Leu-MCA	<i>L</i> -Leucine-4-methylcoumarinyl-7-amid
MF-P	<i>o</i> -Methylfluorescein-Phosphat
MUF	Methylumbelliferon
MUF-P	4-Methylumbelliferyl-Phosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -Nitrophenolphosphat
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -Nitrophenol
RNA	Ribonukleinsäure

## Zusammenfassung

Phosphor (P) ist für jeden Organismus ein lebensnotwendiger Nährstoff. Neben dem Phosphat ist der gelöste organische Phosphor (DOP) die zweitwichtigste P-Quelle für Phytoplanktongemeinschaften. Der Abbau des DOPs erfolgt über Phosphatasen, wodurch Phosphat und niedermolekulare organische Moleküle freigesetzt werden. Damit spielen Phosphatasen eine bedeutende Rolle im aquatischen Phosphorkreislauf. Die wichtigsten Phosphatasen sind die alkalinen Phosphomonoesterasen ( $\text{AlkP}_{\text{asen}}$ ). Sie können verschiedene Phosphomonoester wie Zuckerphosphate, Nukleotide, phosphorylierte Proteine sowie Phosphoanhydride wie Pyrophosphate, ADP und ATP spalten und besitzen damit eine breite Spezifität für den Kohlenstoffanteil der Substratmoleküle.  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  werden von Bakterien, Cyanobakterien und Mikroalgen unter Phosphatmangel synthetisiert und entweder an die Zellwand gebunden (partikuläre  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$ ) oder in die Umgebung abgegeben (gelöste  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$ ). Die Aktivität der  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  ( $\text{AlkPA}$ ) wird seit den 70er Jahren als Indikator genutzt, um eine P-Limitation in Phytoplanktongemeinschaften zu bestimmen. Jedoch haben die Methoden zur Messung der  $\text{AlkPA}$  mehrere Nachteile, welche die Indikatorfunktion stark beeinträchtigen können. Das Ziel dieser Dissertation bestand in der Neubewertung dieser Indikatorfunktion. Dafür wurden drei ökologisch unterschiedliche Gewässer in Bezug auf Gewässertyp, Salinität, Trophiestatus und Phytoplanktonzusammensetzung ausgewählt und über eine gesamte Jahresperiodik hinweg beprobt. Dabei wurden die  $\text{AlkPA}$ , mit den Kinetikparametern  $V_{\text{max}}$  (maximale Reaktionsgeschwindigkeit) und  $K_M$  (Michaeliskonstante), die Nährstoffkonzentrationen und die wichtigsten Biomasseparameter bestimmt. Die partikulären  $\text{AlkPA}$ -Werte wurden mit verschiedenen Grenzwerten aus der Literatur, die eine Einteilung in keine P-Limitation, eine mittlere oder starke P-Limitation ermöglichen, und durch den Vergleich mit anderen gängigen P-Limitationsindikatoren, wie dem N:P- und C:P-Verhältnis im Seston, dem PP:POM-Verhältnis und der Phosphatkonzentration im Umgebungswasser, interpretiert. Die Eignung der gelösten  $\text{AlkPA}$  als P-Limitationsindikator wird durch den Umstand beeinträchtigt, dass nicht nur durch P-limitierte Phytoplankter und Bakterien  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  ins Umgebungswasser freigesetzt werden, sondern auch mit Fäkalpellets von Zooplanktern, durch das Fraßverhalten von Zooplanktern an Algenzellen sowie durch die Zelllyse und virale Lyse von Algenzellen. Zusätzlich sind gelöste  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  langlebig und können einen P-Mangel anzeigen, der bereits einige Tage zurück liegen kann. Von der Nutzung der gelösten  $\text{AlkPA}$  als sensitiver Anzeiger einer P-Limitation in Phytoplanktongemeinschaften wird daher abgeraten. Da die gelöste  $\text{AlkPA}$  einen hohen Anteil an der Gesamt- $\text{AlkPA}$  ausmachen kann, sollte sie immer mitgemessen und von der Gesamt- $\text{AlkPA}$

abgezogen werden. Die partikuläre AlkPA ist generell als P-Limitationsindikator geeignet. Die Normierung mit einem Biomasseparameter, der die AlkP<sub>asen</sub>-produzierende Organismengruppe am besten widerspiegelt, ist ausschlaggebend für die richtige Interpretation der partikulären AlkPA. Die Normierung mit einem ungeeigneten Biomasseparameter kann zu Fehlinterpretationen führen. Die Anwendung der verschiedenen Grenzwerte auf die partikuläre AlkPA führte nicht immer zu den gleichen Ergebnissen und es zeigte sich, dass diese Grenzwerte nicht auf alle Gewässer übertragbar sind. Trotz der Verwendung eines geeigneten Normierungsparameters und Grenzwertes kann die partikuläre AlkPA zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen. Falsch negative Ergebnisse können vorkommen, wenn nur ein Teil der Phytoplanktongemeinschaft von einer P-Limitation betroffen ist, die partikuläre AlkPA jedoch durch einen Biomasseparameter normiert wird, der die gesamte Phytoplanktongemeinschaft beschreibt. Falsch positive Ergebnisse kommen seltener vor und können durch den zeitlichen Versatz, zwischen dem Ende einer P-Limitation und der noch messbaren partikulären AlkPA, zustande kommen. Die Michaeliskonstante wurde zum ersten Mal als möglicher Parameter zur Ermittlung einer P-Limitation in Phytoplanktongemeinschaften ausführlich untersucht. Korrelationsanalysen zwischen dem  $K_M$  und anderen P-Limitationsindikatoren sowie Nährstoffexperimente mit Phosphat und Nitrat zeigten, dass keine einheitliche Reaktion des  $K_M$  auf eine P-Limitation stattfindet. Der  $K_M$  ist daher als sensibler P-Limitationsindikator ungeeignet. Insgesamt hat sich gezeigt, dass nur die partikuläre AlkPA als P-Limitationsindikator verwendet werden sollte. Andere P-Limitationsindikatoren, wie der zellinterne P-Gehalt oder das N:P-Verhältnis im Seston, sollten immer zur Überprüfung der partikulären AlkPA mitgemessen werden.

## Summary

Phosphorus (P) is an essential nutrient for every organism. In addition to phosphate, dissolved organic phosphorus (DOP) is the second most important source of P for the phytoplankton community. The DOP is cleared by phosphatases, which releases phosphate and low molecular weight organic residues. Phosphatases thus play an important role in the aquatic phosphorus cycle. The most important phosphatases are the alkaline phosphomonoesterases (AlkP<sub>ases</sub>). They can cleave various phosphomonoesters such as sugar phosphates, nucleotides, phosphorylated proteins and phosphoanhydrides such as pyrophosphates, ADP and ATP and thus have a broad specificity for the carbon moiety of the substrate molecules. AlkP<sub>ases</sub> are synthesized by bacteria, cyanobacteria and microalgae under a lack of phosphate and either bound to the cell wall (particulate AlkP<sub>ases</sub>) or released into the environment (dissolved AlkP<sub>ases</sub>). The activity of the AlkP<sub>ases</sub> (AlkPA) has been used as an indicator since the 1970s to determine P-limitation in phytoplankton communities. However, the methods for measuring the AlkPA have several disadvantages which can severely impair the indicator function. The aim of this dissertation was to re-evaluate this indicator function. For this purpose, three ecologically different aquatic ecosystems were selected in terms of water type, salinity, trophic status and phytoplankton composition and sampled over the course of the seasons. The AlkPA, with the kinetic parameters  $V_{\max}$  (maximum reaction speed) and  $K_M$  (Michaelis constant), the nutrient concentrations and the most important biomass parameters were determined. The particular AlkPA values were interpreted with different threshold values from the literature, which allow a classification into no P-limitation, a medium or severe P-limitation, and by comparison with other common P-limitation indicators, like the N:P and C:P ratio of the seston, the PP:POM ratio and the phosphate concentration in the surrounding water. The suitability of the dissolved AlkPA as a P-limitation indicator is impaired by the fact that AlkP<sub>ases</sub> are not only released into the surrounding water by P-limited phytoplankton and bacteria, but also with fecal pellets from zooplankton, through the feeding behavior of zooplankton on algal cells and through the cell lysis and viral lysis of algal cells. In addition, dissolved AlkP<sub>ases</sub> are long-lasting and thus can indicate a P deficiency that may have been days before. The use of the dissolved AlkPA as a sensitive indicator of P-limitation in phytoplankton communities is therefore not recommended. Since the dissolved AlkPA can make up a high proportion of the total AlkPA, it should always be measured and subtracted from the total AlkPA. The particulate AlkPA is generally suitable as a P-limitation indicator. The normalization with a biomass parameter, which best reflects the group of organisms that produce AlkP<sub>ases</sub>, is decisive for the correct interpretation of the



particulate AlkPA. Standardization with an unsuitable biomass parameter can lead to misinterpretations. The application of the various threshold values to the particulate AlkPA did not always lead to the same results and hence such threshold values cannot be applied to all aquatic ecosystems. Despite the use of a suitable normalization parameter and threshold value, the particulate AlkPA can lead to false negative or false positive results. False negative results can occur if only part of the phytoplankton community is affected by P-limitation, but the particulate AlkPA is standardized by a biomass parameter that describes the entire phytoplankton community. False positive results occur less often and can come about due to the time lag between the end of a P-limitation and the still measurable particulate AlkPA. The Michaelis constant was examined in detail for the first time as a possible parameter to determine P-limitation in phytoplankton communities. Correlation analyzes between the  $K_M$  and other P-limitation indicators as well as nutrient experiments with phosphate and nitrate showed, that there is no uniform reaction of the  $K_M$  to P-limitation. The  $K_M$  is therefore unsuitable as a sensitive P-limitation indicator. Overall, only the particulate AlkPA should be used as the P-limitation indicator. Other P-limitation indicators such as the cell-internal P content or the N:P ratio in the seston should always be measured additionally to check the particulate AlkPA.

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Phosphor im biogeochemischen Kreislauf der Gewässer

Phosphor (P) ist für jeden Organismus ein lebensnotwendiges Element. Er ist Bestandteil von Nukleotiden und damit der DNA- und RNA-Moleküle als Trägersubstanz der Erbinformation. Phosphor findet sich auch in Phospholipiden, welche die wichtigsten Bestandteile der Zellmembranen darstellen, sowie in Phosphoproteinen und Zuckerphosphaten. Des Weiteren ist P Bestandteil der Energieträgermoleküle ATP und GTP, und trägt durch dessen Übertragung mithilfe phosphorylierender Enzyme auf Proteine, Kohlenhydrate und Lipide wesentlich zur Signalweiterleitung und Regulierung von Stoffwechselprozessen bei (Paytan und McLaughlin 2007; Karl 2014).

Natürliche P-Quellen sind vor allem phosphathaltige Mineralien (z.B. Apatite –  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F, Cl, OH})$ ). Durch deren Verwitterung, aber auch durch deren industriellen Abbau und Produktion zu Düngemitteln, gelangt P auf die Böden. Über die Atmosphäre können P-haltige Stäube aus Bodenpartikeln (z. B. Saharastaub, vulkanische Asche), biologischen Partikeln (z. B. Pollen) und Aerosole aus landwirtschaftlichen Düngemitteln und der industriellen Verbrennung transportiert und durch trockene und nasse Deposition auf Böden und in die Gewässer eingebracht werden (Tipping et al. 2014; Berthold et al. 2019). Über Oberflächenerosion und Nährstoffauswaschung intensiv gedüngter Böden, sowie durch Abwässer von landwirtschaftlichen Flächen, Tierhaltungsbetrieben, Industrie und Kommunen (z.B. in Form von Exkrementen und P-haltigen Waschmitteln) gelangt P in die Gewässer und von dort ins Meer (Carpenter et al. 1998; Bennett et al. 2001).

Photoautotrophe Organismen nehmen P bevorzugt in Form von Orthophosphorsäure auf (in Seewasser bei 20°C, pH von 8,0 und Salinität von 33 vorliegend als 1%  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 87%  $\text{HPO}_4^{2-}$  und 12%  $\text{PO}_4^{3-}$ ; wird im Folgenden als Phosphat bezeichnet), bauen es in ihre Makromoleküle ein und bringen es damit in eine partikuläre Form (POP = partikulärer organischer Phosphor; Abb. 1.1). Durch Fraß von heterotrophen Organismen durchläuft das POP die Nahrungskette und endet als Detritus sedimentiert auf dem Gewässerboden. Der Detritus besteht aus abgestorbenen Organismen, aggregierten Phytoplanktonzellen, Exkrementen und, durch das Fraßverhalten von Zooplanktern entstandene, grobe Organismenpartikel (Møller 2007). Bereits in der Wassersäule und am Gewässerboden, wird der Detritus von Bakterien besiedelt und zu

einfachen Monomeren und gelösten organischen Nährstoffen abgebaut. Dabei wird auch der POP zu gelösten organischen (DOP) und anorganischen (DIP) P-Verbindungen zersetzt.

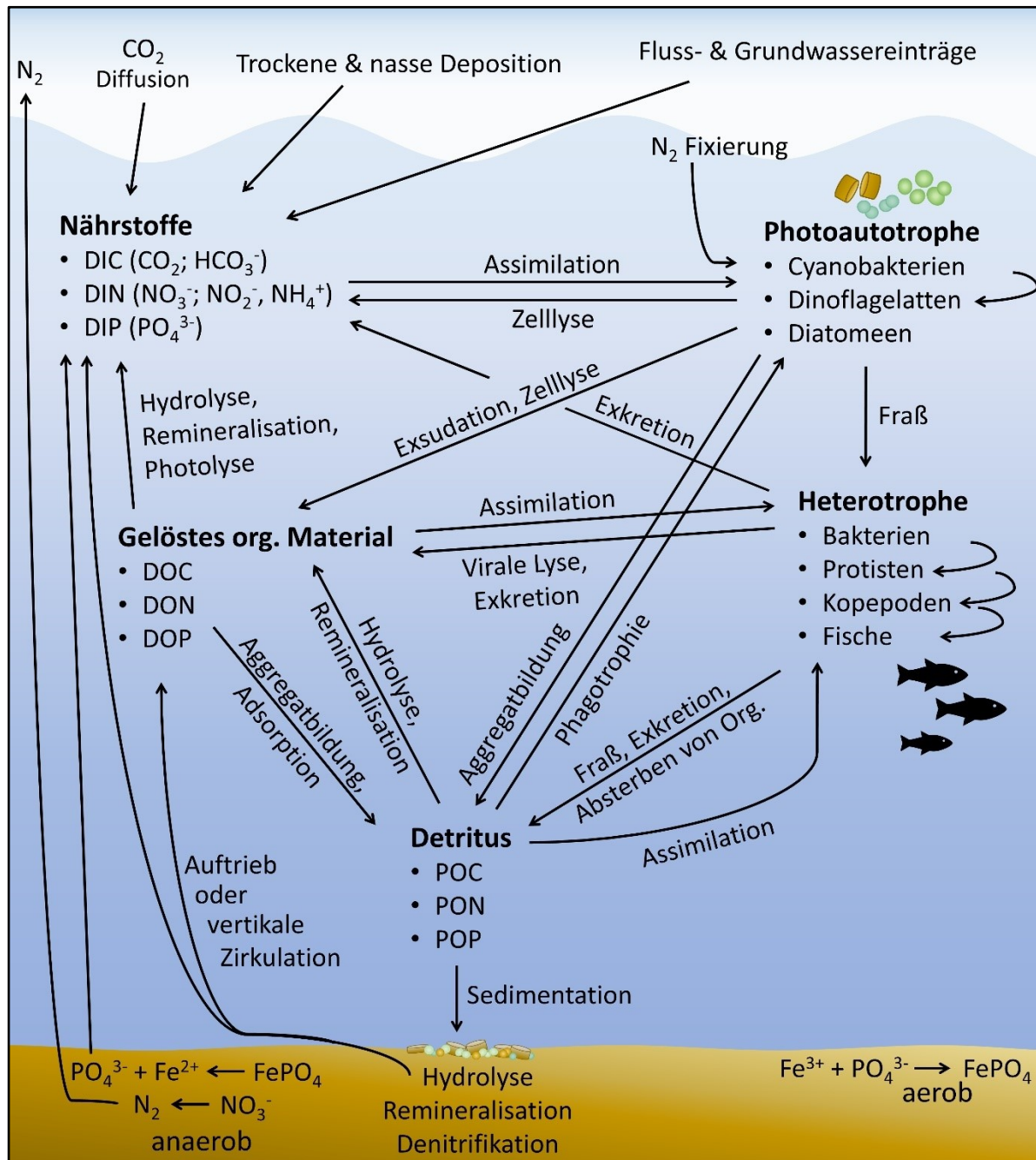


Abb. 1.1: Die Biogeochemischen Nährstoffkreisläufe im Meer, verändert nach Kreuz et al. (2015); DOC, N, P = gelöster organischer Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor; DIC, N, P = gelöster anorganischer Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor; POC, N, P = partikulärer organischer Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor

Durch die fortwährende Remineralisation des absinkenden Detritus in der Wassersäule nehmen die Nährstoffkonzentrationen mit der Wassertiefe zu. Gleichzeitig steigen die

C:N:P-Verhältnisse des partikulären (POM) und gelösten (DOM) organischen Materials mit der Tiefe an, da P- und Stickstoff (N)-haltige Moleküle bevorzugt abgespalten werden (Kolowitz et al. 2001; Paytan und McLaughlin 2007). Durch Auftriebsereignisse oder vertikale Zirkulation gelangen die remineralisierten Nährstoffe und DOM-Verbindungen aus dem Tiefenwasser wieder an die Wasseroberfläche und können von Phytoplanktern erneut genutzt werden (Whitton et al. 1991; Moore et al. 2005). Das verbleibende DOM in der Tiefe mit hohen C:N:P-Verhältnissen ist schwer abbaubar und kann dauerhaft am Gewässerboden sedimentieren (biologische Kohlenstoffpumpe). Durch die Adsorption an Eisenoxiden oder anderen mineralischen Partikeln unter aeroben Bedingungen kann Phosphat dauerhaft aus der Wassersäule entfernt werden (Phosphorfalle) (Diaz et al. 2008). Unter hypoxisch und anaeroben Bedingungen kann Eisen-gebundenes Phosphat wieder freigesetzt werden (Mort et al. 2010).

Neben dem Abbau von POM zu DOM, kann DOM auch durch die Exsudation von Phytoplanktonzellen, dem Fraßverhalten von Zooplanktern oder durch Exkretion von heterotrophen Organismen sowie durch virale Zelllyse und Autolyse von Bakterien- und Phytoplanktonzellen direkt in die Wassersäule gelangen (Abb. 1.1; Bratbak et al. 1994; Gobler et al. 1997; Möller 2007; Condon et al. 2010; Mühlenbruch et al. 2018). Bedingt durch mikrobielle Remineralisation oder Photolyse wird das DOM in der Wassersäule weiter zersetzt und geht erneut in das Nährstoffreservoir ein. Quellen für DOP-Moleküle, wie Exsudation, Exkretion, Autolyse und Zelllyse, scheinen an der Wasseroberfläche am höchsten zu sein, da dort auch die höchsten DOP-Konzentrationen zu messen sind (Karl und Björkman 2014). Mit zunehmender Wassertiefe und fortschreitender DOP-Remineralisation nimmt deren Konzentration ab. Im Gegensatz dazu ist die Phosphatkonzentration an der Wasseroberfläche am niedrigsten und steigt mit zunehmender Wassertiefe an (Paytan und McLaughlin 2007; Karl und Björkman 2014). Damit ist das marine DOP-Reservoir an der Wasseroberfläche eine wichtige P-Quelle für Phytoplanktongemeinschaft (Labry et al. 2005). Der Hauptanteil des DOP-Reservoirs umfasst mit 50 – 80% niedermolekulare Moleküle (< 10 kDa) und zu 15 – 30% hochmolekulare Moleküle (> 50 kDa) (Paytan und McLaughlin 2007). Es besteht zu 80 – 85% aus Phosphatestern, 5 – 10% aus Phosphonate und zu 8 – 13% aus Polyphosphate (Tabelle 1.1; Paytan und McLaughlin 2007; Diaz et al. 2008; Young und Ingall 2010; Karl und Björkman 2014; Van Mooy et al. 2015). Zu den Phosphatestern gehören Phosphoproteine, Zuckerphosphate, Phospholipide, Nukleotide, Nukleinsäuren und einige Vitamine. Der Abbau des DOP erfolgt über verschiedene hydrolytische Enzyme, wodurch anorganische Nährstoffe wieder frei werden (Tabelle 1.1; Karl und Björkman 2014; Lin et al. 2016; Paytan und McLaughlin 2007).

Tabelle 1.1: Die Bestandteile des gelösten Phosphors im Gewässer, unterteilt in gelöste anorganische und gelöste organische Phosphorverbindungen, sowie die spezifischen Enzyme für deren Phosphatabspaltung; Quellen: Cembella et al. 1984; Paytan und McLaughlin 2007; Karl und Björkman 2014; Lin et al. 2016

DP	Chemische Bindung		Beispiele	Enzyme zur P-Abspaltung
DIP	Orthophosphate		Phosphorsäure, Hydrogenphosphat, Dihydrogenphosphat, Phosphat	
	Pyrophosphate	Phosphoanhydrid-Bindung (P-O-P)	2 Phosphatgruppen z. B. Pyrophosphorsäure, ADP	Pyrophosphatasen Phosphomonoesterasen
	Polyphosphate	Phosphoanhydrid-Bindung (P-O-P-O-P)	≥ 3 Phosphatgruppen z. B. Polyphosphatketten, ATP	Polyphosphatkinasen Exopolyphosphatasen Endopolyphosphatasen Phosphomonoesterasen
	Phosphite		Trimethylphosphit	
DOP	Phosphatester	Phosphatmonoester-Bindung (C-O-P)	Zuckerphosphate (Glucose-6-Phosphat, Phytat) Nukleotide und ihre Derivate (ATP, GDP, NADP) Phosphorylierte Proteine Vitamin B1 und B2	Alkaline & saure Phosphomonoesterasen Zucker-Phosphatasen Phytasen Nukleotidasen Protein-Phosphatasen
		Phosphatdiester-Bindung (C-O-P-O-C)	Nukleinsäuren (DNA, RNA) Phospholipide Vitamin B12	Nukleasen Phosphodiesterasen Phospholipasen
	Phosphonate	C-P-Bindung	Phosphonolipide	C-P Lyasen C-P Hydrolasen

C = Kohlenstoff; DIP = gelöster organischer Phosphor; DOP = gelöster organischer Phosphor; DP = gelöster Phosphor; O = Sauerstoff; P = Phosphor

Als Anpassung auf geringe Phosphatkonzentrationen in der aquatischen Umgebung verfügen Bakterien und Phytoplankter über komplexe zelluläre Regulationsmechanismen (Lin et al. 2016). Dazu zählt der Austausch von niedrigaffinen Phosphat-Transportern durch hochaffine Phosphat-Transporter, um auch unter sehr geringen Phosphatkonzentrationen in der Umgebung weiter Phosphat in die Zellen aufnehmen zu können. Ein weiterer Anpassungsmechanismus beinhaltet die Reduktion des intrazellulären P-Bedarfs durch den Austausch von Phospho- mit Sulfolipiden in den Zellmembranen (Van Mooy et al. 2006; Van Mooy et al. 2009; Martin et al. 2011). Da in P-limitierten Gewässern das DOP-Reservoir das Phosphatreservoir um ein vielfaches übersteigt, ist die Nutzung von DOP-Molekülen einer der wichtigsten Anpassungsmechanismen gegenüber P-Stress (McLaughlin et al. 2013; Li et al. 2016). Einige niedermolekulare DOP-Moleküle können direkt von Mikroorganismen aufgenommen werden. Die enzymatische Abspaltung des Phosphatmoleküls erfolgt dann intrazellulär oder bei Bakterien und Cyanobakterien im periplasmatischen Raum (Luo et al. 2009; White 2009; Lin et al. 2018). Die P-Nutzung von niedermolekularen, geladenen DOP-Molekülen wie Zucker-Phosphate und Nukleotide sowie von mittel- und hochmolekularen DOP-Molekülen bedürfen der extrazellulären enzymatischen Abspaltung des Phosphatmoleküls von dem restlichen organischen Material, da diese die Plasmamembranen nicht direkt passieren können (Whitton et al. 1991; Moore et al. 2005; Whitton et al. 2005; Wang et al. 2011). Die Enzyme, die solche Reaktionen katalysieren, zählen zu der großen Gruppe der Phosphatasen. Bakterien und Cyanobakterien sind zudem in der Lage, neben DOP-Molekülen, auch Phosphonate und Phosphite aufzunehmen und zu verstoffwechseln (Ilikchyan et al. 2009; Voß et al. 2013). Vertreter der Dinoflagellaten, Haptophyta und Pelagophyta können auch durch die Phagotrophie von organischen Partikeln, Bakterien und Cyanobakterien ihren P-Bedarf decken (Abb. 1.1; Carvalho und Granéli 2010; Jeong et al. 2012; Lin et al. 2016).

Die Phosphatasen sind die wichtigsten Enzyme in der P-Remineralisierung. Sie spalten durch Hydrolyse Phosphoester- und Phosphoanhydridbindungen von Phosphatestern, Pyro- und Polyphosphaten (Tabelle 1.1). Damit gehören Phosphatasen zu den Hydrolasen und innerhalb derer zu den Esterasen (NC-IUBMB; Chróst 1991). Je nach dem Substrattyp, der gespalten wird, unterteilt man Phosphatasen in Phosphomonoesterasen, Phosphodiesterasen und Nukleasen. Zu den Phosphomonoesterasen gehören die alkalinen und sauren Phosphomonoesterasen, Protein-Phosphatasen, Nukleotidasen, Zucker-Phosphatasen und Phytasen. Sie spalten, wie der Name schon sagt, die Esterbindung von Phosphomonoestern (Abb. 1.2). Zu den Phosphodiesterasen zählen Phospholipasen und eine Vielzahl an verschiedenen Phosphodiesterasen (NC-IUBMB). Sie spalten die erste Esterbindung eines Phosphordiesters. Als Produkte

entstehen ein Phosphomonoester und ein Rest. Die finale Abspaltung des Phosphats erfolgt dann wieder über eine Phosphomonoesterase. Die häufigsten, in Gewässern vorkommenden Phosphatasen, sind die alkalinen Phosphomonoesterasen, die Phosphodiesterasen und die 5'-P-Nukleotidasen (Hoppe 2003). Die alkalinen Phosphomonoesterasen sind die am best-untersuchten Enzyme zur DOP-Nutzung.

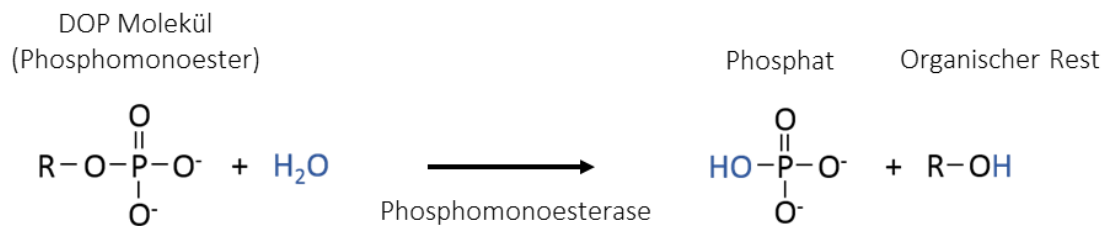


Abb. 1.2: Die enzymatische Spaltung einer Phosphomonoesterbindung durch eine Phosphomonoesterase

Saure Phosphomonoesterasen (AcidP<sub>asen</sub>) spielen beim Abbau von DOP-Molekülen keine große Rolle. Sie liegen in Organismen eher intrazellulär vor und erfüllen wichtige Funktionen im Stoffwechsel der Zellen (Cooper et al. 1974; Cembella et al. 1984a). Es sind konstitutive Enzyme die, unabhängig von der P-Versorgung der Zelle oder dem Stand des Stoffwechsels, kontinuierlich und mit gleich bleibender Rate synthetisiert werden (Kuenzler und Perras 1965; Møller et al. 1975; Wynne 1977). Im Gegensatz dazu dienen die alkalinen Phosphomonoesterasen (AlkP<sub>asen</sub>) hauptsächlich der P-Abspaltung von DOP-Molekülen (Kuenzler und Perras 1965; Cembella et al. 1984; Whitton et al. 1991). Die Expression der AlkP<sub>asen</sub>-Gene wird reguliert von der Phosphatkonzentration innerhalb und außerhalb der Zelle (Ray et al. 1991; Mouillon und Persson 2006; Xu et al. 2010; Lin et al. 2012b). Dies macht die AlkP<sub>asen</sub> zu Phosphat-reprimierbaren Enzymen (Degerholm et al. 2006; Lin et al. 2018). Die Aktivität der AlkP<sub>asen</sub> (AlkPA) wird durch Phosphat kompetitiv gehemmt (Jansson 1976; Chróst und Overbeck 1987; Jansson et al. 1988). AlkP<sub>asen</sub> sind hochspezifisch für die Phosphomonoesterbindung, jedoch recht unspezifisch für den organischen Teil der DOP-Moleküle (Cembella et al. 1984; Hoppe 2003). Daher können AlkP<sub>asen</sub> eine Vielzahl an verschiedenen Phosphomonoestern binden und spalten.

Bakterielle AlkP<sub>ase</sub>-Gene gehören zu den drei Genfamilien *PhoA*, *PhoD* und *PhoX* (Luo et al. 2009; Lin et al. 2018). Luo et al. (2009) identifizierten den zellulären Standort von bakteriellen AlkP<sub>asen</sub> anhand von 3733 bakteriellen AlkP<sub>ase</sub>-Gensequenzen aus der Gendatenbank der globalen „Ocean Sampling Expedition“. Sie fanden heraus, dass 41% der bakteriellen AlkP<sub>asen</sub> im

zytoplasmatischen Raum, 17% im periplasmatischen Raum, 12% an der äußeren Membran und 0,9% an der inneren Membran lokalisiert waren. 30% entsprachen extrazellulären AlkP<sub>asen</sub>, die an die Umgebung abgegeben werden. Bakterien besitzen auch Transporter, um DOP-Moleküle aufzunehmen. Deren Hydrolyse wird vermutlich von den zytoplasmatischen AlkP<sub>asen</sub> übernommen (Luo et al. 2009). Die AlkP<sub>asen</sub> der Algen sind sehr viel schlechter untersucht. *PhoA*, *PhoD* und *PhoX* ähnliche Gene, aber auch atypische AlkP<sub>asen</sub>, wurden in verschiedenen Algenklassen beschrieben (Xu et al. 2010; Dyhrman et al. 2012; Lin et al. 2012b; Lin et al. 2012a; Lin et al. 2013). Dazu zählen wiederum intrazelluläre, Membran- oder Zellwandgebundene sowie an die Umgebung abgegebene, extrazelluläre AlkP<sub>asen</sub> (Quisel et al. 1996; Hallmann 1999; Xu et al. 2006; Dyhrman et al. 2012; Lin et al. 2012; Lin et al. 2013).

## 1.2 Die alkaline Phosphataseaktivität als Indikator für den Phosphorstatus einer Phytoplanktongemeinschaft

In den 60er und 70er Jahren zeigten Kulturversuche, dass die Produktion von AlkP<sub>asen</sub> durch Mikroalgen abhängig ist von der Phosphatverfügbarkeit im Medium. Ein Phosphatmangel leitete die Produktion von AlkP<sub>asen</sub> bei einer Vielzahl von limnischen und marinen Algenarten ein (Kuenzler und Perras 1965; Fitzgerald und Nelson 1966; Healey und Hendzel 1979a). Seither wird die AlkPA als Indikator für einen P-Stress in aquatischen Umweltproben genutzt (Jansson et al. 1988; Vidal et al. 2003; Degerholm et al. 2006; Mateo et al. 2010; Ivančić et al. 2016; Kang et al. 2019).

Um die AlkPA zu messen werden artifizielle Substrate verwendet. Nach der enzymatischen Abspaltung des Phosphatmoleküls von dem artifiziellen Substrat entsteht ein Produkt, welches photometrisch oder fluorometrisch gemessen werden kann. In der aquatischen Ökologie werden folgende Substrate häufig genutzt: *p*-Nitrophenolphosphat (*p*-NPP; Patni et al. 1974), 3-*o*-Methylfluorescein-Phosphat (MF-P; Perry 1972a) und 4-Methylumbelliferyl-Phosphat (MUF-P; Pettersson 1980; Hoppe 1983a). Die Enzymaktivität wird in einer natürlichen Wasserprobe oder Zellkultur bestimmt. Dabei wird nicht nur die Aktivität eines einzelnen Enzyms, sondern vielmehr die Aktivität eines Enzymgemisches mit Enzymen unterschiedlicher Herkunft gemessen. Daher spricht man auch von einer apparenten Enzymaktivität.

Die AlkP<sub>asen</sub> folgen der Michaelis-Menten-Kinetik (Hoppe 2003). Gemessen unter standardisierten Laborbedingungen und unter verschiedenen Substratkonzentrationen können die



Kinetikparameter  $V_{\max}$  (maximale Reaktionsgeschwindigkeit) und  $K_M$  (Michaeliskonstante) berechnet werden (Bergmeyer und Gawehn 1977). Unter einer Substratkonzentration, bei der alle vorhandenen Enzyme mit Substrat gesättigt sind, ist  $V_{\max}$  äquivalent zur Menge der vorhandenen Enzyme. Der  $K_M$ \* entspricht der Substratkonzentration, bei der die Hälfte des  $V_{\max}$  erreicht wird. Er ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zu dem Substrat. Niedrige  $K_M$ -Werte zeigen eine hohe Affinität, hohe  $K_M$ -Werte eine niedrige Affinität des Enzyms zu dem Substrat an (Jansson et al. 1988).

Die extrazelluläre, frei gelöste AlkPA kann von Bakterien und/oder Phytoplanktern stammen. Zooplankter und Protozoen tragen ebenfalls zu der frei gelösten AlkPA bei (Jansson 1976; Nagata und Kirchman 1992). Um die gelöste AlkPA von der Partikel assoziierten AlkPA zu unterscheiden, wird die AlkPA oft zusätzlich, neben der Messung in der Vollprobe, im partikelfreien Filtrat ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ) gemessen. Eine weitere Größenfraktionierung kann genutzt werden, um die partikuläre AlkPA in eine Bakterien- ( $0,2 - 1 \mu\text{m}$ ) und Phytoplanktonbasierte ( $> 1 \mu\text{m}$ ) AlkPA zu trennen (Labry et al. 2005).

Um die AlkPA auf die Biomasse im Gewässer zu normieren werden verschiedene Normierungsparameter genutzt: Chlorophyll *a*, Seston, POM, ATP, Zellabundanz, Kohlenstoffgehalt. Dies erschwert die Vergleichbarkeit verschiedener Studien miteinander. Am häufigsten wird der Chlorophyll *a*-Gehalt verwendet. Sala et al. (2001) schlugen das Verhältnis der AlkPA zur Aminopeptidaseaktivität (AlkPA/PepA) vor. Aminopeptidasen werden hauptsächlich von Bakterien und im geringen Maße von Phytoplanktern produziert. Mit ihnen werden Peptide und Proteine hydrolysiert und somit das marine organische N-Reservoir remineralisiert. Das Verhältnis der AlkPA/PepA wurde von Sala et al. (2001) als geeigneter Parameter beschrieben, um in einer mikrobiellen Gemeinschaft zwischen einer N- oder P-Limitation zu unterscheiden. Die PepA kann zudem als Aktivitätsparameter der Bakteriengemeinschaft genutzt werden (Andersen-Elvehoy und Thingstad 1991). Es besteht die Frage, ob sich die Kernaussage der AlkPA über den Status des P-Bedarfs einer Phytoplanktongemeinschaft verändert, wenn diese mit verschiedenen Biomasseparametern oder der PepA normiert wurde. Und ob sich ein Parameter für die Normierung finden lässt, der für alle Gewässer geeignet ist.

Da die Messung der AlkPA schnell durchzuführen ist, wird die AlkPA als Indikator für einen P-Stress häufig genutzt. Die Interpretation der AlkPA-Werte ist jedoch schwierig. Ab welchem Wert zeigt die AlkPA eine leichte oder starke P-Limitation an? In Gewässern besteht durch das Vorhandensein von AlkP<sub>asen</sub>, die durch das Fraßverhalten von Zooplanktern, virale Lyse oder Autolyse von Phytoplanktern frei werden, ein „Grundrauschen“, welches von Gewässer zu

\* Ob es der  $K_M$  oder die  $K_M$  heißt, darüber kann man sich streiten

Gewässer unterschiedlich hoch sein kann. Außerdem wird davon ausgegangen, dass intrazelluläre, konstitutive  $\text{AcidP}_{\text{asen}}$  und intrazelluläre, reprimierbare  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  mit den genutzten Methoden nicht mitgemessen werden. Da die Substrate von hydrophobem Charakter sind, passieren diese Substrate möglicherweise doch die Zellmembran. Damit würde die intrazelluläre saure Phosphataseaktivität ( $\text{AcidPA}$ ) auch zu diesem Grundrauschen beitragen. Um die  $\text{AlkPA}$  in natürlichen Umweltproben zu interpretieren wurden verschiedene Grenzwertsysteme vorgeschlagen (Healey und Hendzel 1979b; Healey und Hendzel 1979a; Pettersson 1980; Gage und Gorham 1985; Tabelle A1). Diese Grenzwerte sollten es ermöglichen die  $\text{AlkPA}$ -Werte zu interpretieren und in ein Grundrauschen, eine leichte, mittlere oder starke P-Limitation einzuteilen. Ermittelt wurden die Grenzwerte anhand von Phytoplanktonkulturen, die unter ausreichenden und limitierten P-Bedingungen gehalten wurden, sowie anhand natürlicher limnischer Phytoplanktongemeinschaften. Eine Evaluierung der Übertragbarkeit dieser Grenzwerte auf andere limnische, brackige oder marine Ökosysteme blieb bisher aus. Auch nutzen die meisten Studien diese Grenzwerte nicht zur Interpretation ihrer Ergebnisse.

Der  $K_M$  wurde bisher nur selten zur Bewertung des P-Status von Phytoplanktongemeinschaft gemessen und interpretiert (Jansson et al. 1988; Hoppe 2003). Da mit den gängigen Methoden die  $\text{AlkPA}$  eines Enzymgemischs gemessen wird, spricht man von einem apparenten  $K_M$ . In dieser Dissertation soll geprüft werden, ob mit dem apparenten  $K_M$  Aussagen über den P-Status einer Phytoplanktongemeinschaft getroffen werden können.

### 1.3 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand in der Neubewertung der  $\text{AlkPA}$  als Indikator für eine P-Limitation in natürlichen Phytoplanktongemeinschaften. Zum ersten Mal wurde hierfür auch die Michaeliskonstante als möglicher Parameter untersucht. Folgende Hypothesen wurden für die Arbeit formuliert:

- 1) Der Normierungsparameter beeinflusst das Ergebnis und die Interpretation der  $\text{AlkPA}$
- 2) Die Grenzwerte aus der Literatur zur Interpretation der  $\text{AlkPA}$  lassen sich nicht auf jedes Gewässer übertragen
- 3) Die Parameter der  $\text{AlkPA}$  ( $V_{\text{max}}$  und  $K_M$ ) sind nicht geeignet, den Status des P-Bedarfs einer Phytoplanktongemeinschaft sicher einzuschätzen

Zur Prüfung der Hypothesen wurden drei ökologisch unterschiedliche Gewässer über eine gesamte Jahresperiodik hinweg beprobt. Dabei wurde die  $\text{AlkPA}$ , mit den beiden

Kinetikparametern  $V_{\max}$  und  $K_M$ , sowie verschiedene Biomasseparameter, die Nährstoffkonzentrationen und die Aminopeptidaseaktivität (PepA) gemessen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die AlkPA in mehreren Größenklassen bestimmt, um die AlkPA den Planktonfraktionen zuzuordnen und Aussagen über deren Herkunft treffen zu können. Als Biomasseparameter wurden gängige Größen quantifiziert wie der Chlorophyll *a*-, Seston-, POM- und POC (partikulärer organischer Kohlenstoff)-Gehalt sowie die Bakterienabundanz. Um den Einfluss des Normierungsparameters auf die Interpretation der AlkPA zu evaluieren, wurde die AlkPA in Bezug zu verschiedenen Biomasseparametern und der PepA gesetzt und diese verglichen. Um die Reaktion der AlkPA auf eine P-Mangelsituation zu testen, wurde in einer natürlichen Umweltprobe die Reaktion von  $V_{\max}$  und  $K_M$  auf die Zugabe von Phosphor und Nitrat, einzeln und zusammen in verschiedenen Verhältnissen, untersucht. Zusätzlich wurde eine Korrelationsanalyse mit den Langzeitdaten zwischen der AlkPA ( $V_{\max}$  und  $K_M$ ) und anderen P-Limitationsanzeigern durchgeführt und daraus die Eignung der AlkPA als P-Limitationsindikator bewertet. Dabei wurden verschiedene Grenzwerte aus der Literatur zur Interpretation der AlkPA genutzt und miteinander verglichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsgebiete

Es wurden drei unterschiedliche Gewässer in Bezug auf Gewässertyp, Salinität, Trophiestatus und Phytoplanktonzusammensetzung ausgewählt (Tabelle 2.1; Abb. 2.1 a). Die Küste der brackigen Ostsee innerhalb der Mecklenburger Bucht, die Warnow als Süßwasserfluss, der in die Mecklenburger Bucht mündet, und eine brackige Lagune, die Darß-Zingster Boddenkette, die ebenfalls in die Ostsee mündet. Im Folgenden werden alle drei Gewässer kurz vorgestellt.

Tabelle 2.1: Die Charakteristiken der drei untersuchten Gewässer in Bezug auf Gewässertyp, Salinität und Trophiestatus

	Ostseeküste (Mecklenburger Bucht)	Warnow	Darß-Zingster Bodden- kette
Gewässertyp:	Meer	Fluss	Lagune
Salinität:	mesohalin	limnisch	oligo-mesohalin
Trophie:	mesotroph	meso-eutroph	eu-hypertroph

Die Mecklenburger Bucht gehört zur Beltsee (südwestlichen Ostsee) und reicht von Fehmarn bis zur Darßer Schwelle (Abb. 2.1 a). Mit einer maximalen Wassertiefe von 25 m ist der Wasserkörper meistens geschichtet. Der Beginn der Diatomeen-dominierten Frühjahrsblüte wird durch die Temperatur bestimmt (Fennel 1999). Die Sommerblüte im August wird hauptsächlich von Diatomeen und auch von Dinoflagellaten gebildet. Sommerliche Cyanobakterienblüten sind in der Mecklenburger Bucht eher untypisch. Die Herbstblüte, mit ihrem Höhepunkt im November, besteht wiederum hauptsächlich aus Diatomeen und Dinoflagellaten (Wasmund et al. 2004; Wasmund et al. 2014; Wasmund et al. 2017). Die wichtigsten Flüsse, die in die Mecklenburger Bucht entwässern, sind die Warnow und die Trave. Seit den frühen 90er Jahren führten diverse Maßnahmen, wie die Einführung von P-freien Waschmitteln, eine generell gesunkene Abwassermenge und die Sanierung der Kläranlagen der wichtigsten Städte Mecklenburg-Vorpommerns, zu einem deutlichen Rückgang der Stickstoff- und Phosphoreinträge in die Ostsee (LUNG 2013). Trotz dieser Bemühungen sind die Nährstoffkonzentrationen und Chlorophyllgehalte in den deutschen Küstengewässern der Ostsee nach wie vor zu hoch. Der ökologische Zustand der Küstengewässer der Mecklenburger Bucht wurde demnach als mäßig eingestuft (Nausch 2011; LUNG 2013).

Die Warnow ist ein typischer Tieflandfluss. Er entspringt in Mecklenburg-Vorpommern bei Grebbin und mündet nach 164 km in die Mecklenburger Bucht der Ostsee. Die Warnow wird durch den sogenannten Mühlendammwehr in die Oberwarnow und die brackige Unterwarnow unterteilt (Abb. 2.1 c). Über die Warnow entwässert mit 3324 km<sup>2</sup> das zweitgrößte Einzugsgebiet Deutschlands in die Ostsee (BLANO 2014). Das Einzugsgebiet besteht vorwiegend aus landwirtschaftlich genutzten Flächen und weist einen stark anthropogen veränderten Wasserhaushalt auf (Koch et al. 2018). Die Oberwarnow ist im Oberlauf ein flacher, schnell fließender Fluss der mehrere Seen durchfließt (Hübener et al. 1989; Bahnwart et al. 1999). Im Unterlauf wird die Oberwarnow tiefer, breiter und weist durch ein geringes Höhengefälle niedrigere Fließgeschwindigkeiten auf (Hübener et al. 1989; Bahnwart et al. 1999). Die lange Verweilzeit und geringe Turbulenz im Wasserkörper des Unterlaufs führen zwischen Bützow und Rostock zu einer steigenden Phytoplanktonentwicklung (Hübener et al. 1989; Bahnwart et al. 1999). Die Frühjahrsblüte im Unterlauf wird von zentrischen Diatomeen und filamentösen Cyanobakterien dominiert. Warme und ruhige Wetterbedingungen im Sommer begünstigen Cyanobakteriendominanzen zusammen mit Chlorophyceen (Hübener et al. 1989; Bahnwart et al. 1999). Im Herbst folgt mit sinkenden Temperaturen und steigenden Nährstoffkonzentrationen erneut eine Diatomeenblüte, die stärker ausgeprägt sein kann als die Frühjahrsblüte (Hübener et al. 1989; Bahnwart et al. 1999). Stickstoff- und Phosphoreinträge in die Oberwarnow stammen hauptsächlich aus diffusen Quellen wie der Landwirtschaft und haben sich quantitativ seit den 90er Jahren nicht wesentlich verändert (LUNG 2013). Damit ist die Warnow gemäß der Wasserrahmen-Richtlinie nach wie vor eutrophiert und in einem schlechten ökologischen Zustand (Nausch 2011; LUNG 2013).

Die Darß-Zingster Boddenkette ist eine gezeitenlose Lagune, welche weitgehend von der Ostsee abgetrennt ist und mit derselben über flache Schwellen in unregelmäßigem Austausch steht (Schlungbaum und Baudler 2001). Mehrere Fließgewässer wie die Recknitz, Barthe, Saaler Bach und Wallbach entwässern in die Boddenkette und damit ein Einzugsgebiet von insgesamt 1578 km<sup>2</sup>. Die Darß-Zingster Boddenkette besteht aus mehreren Bodden die kettenförmig aneinandergereiht sind. Durch die Abgrenzung zur Ostsee weist das Lagunensystem einen Salinitätsgradienten (1 – 14) von West nach Ost und einen Trophiegradienten (eu – hypertroph) von Ost nach West auf.

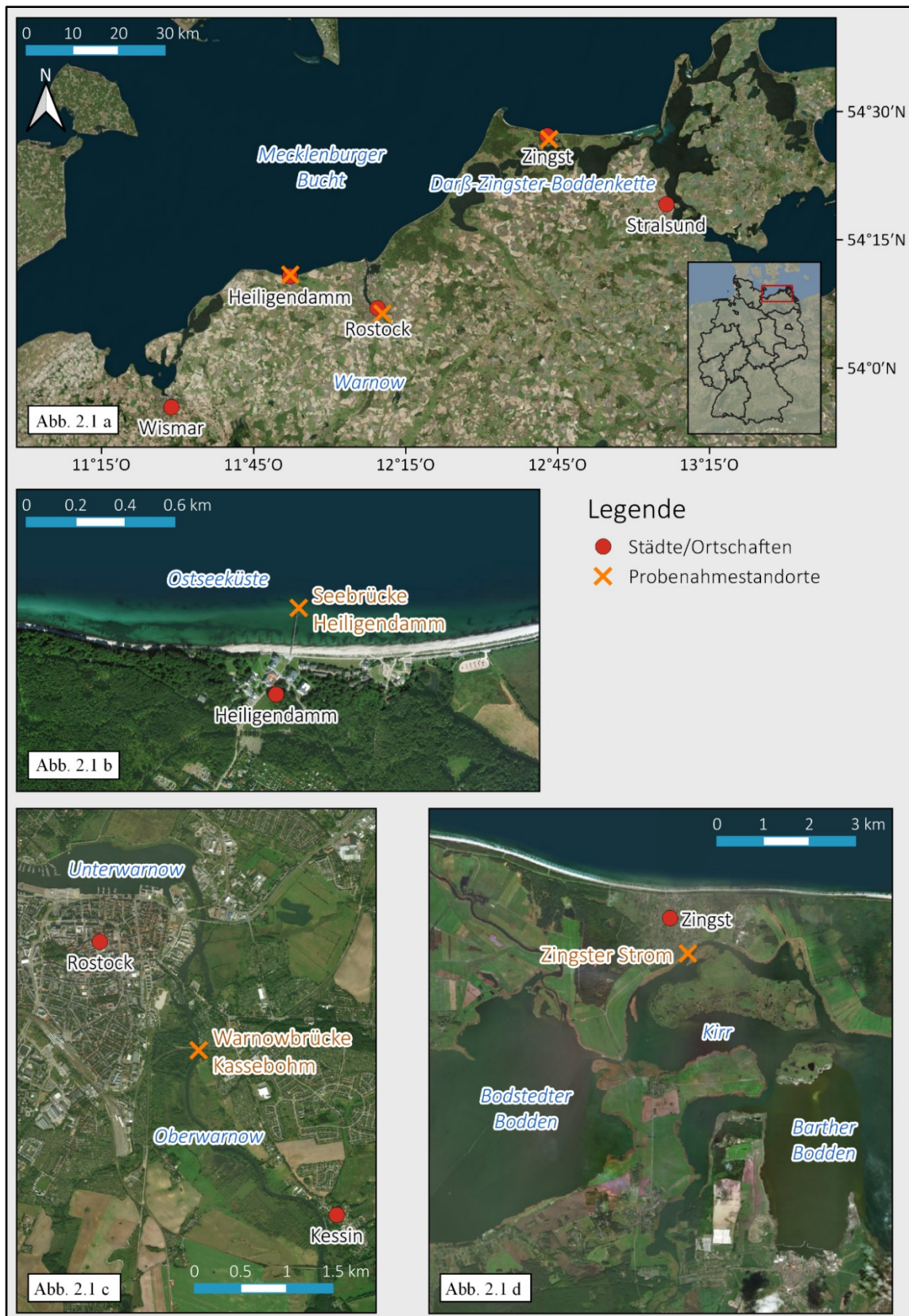


Abb. 2.1: Die Ostseeküste von Mecklenburg-Vorpommern (a) mit den beprobten Standorten Ostsee (b) Warnow (c) und Zingster Strom (d); Programm: QGIS 3.4; Karten: ESRI Satellitenbilder; Quellen: Bundesamt für Kartographie und Geodäsie, Frankfurt am Main, 2011

Über den Zingster Strom erfolgt der Hauptwasseraustausch zwischen dem limnisch geprägten Westteil und dem brackig geprägten Ostteil (Abb. 2.1 d). Die Darß-Zingster Boddenkette weist mit einer allgemein geringen Gewässertiefe (im Mittel 2 m und polymiktisch), der gegliederten Struktur und des geringen Wasseraustausches mit der vorgelagerten Ostsee, naturbedingt eine hohe biologische Produktion auf und dient, durch ein hohes Nährstoffrückhaltevermögen, als Nährstoff-Filter zur vorgelagerten Ostsee (Schlungbaum et al. 2001). Damit sind die Bodden auch besonders anfällig gegenüber Eutrophierung. Die intensive Landwirtschaft im Einzugsgebiet und die damit verbundenen hohen Nährstoffeinträge über die Fließgewässer führten bis in die 80er Jahre zu einer von Ost nach West zunehmenden Eutrophierung (Schiewer 1998). Seit 1990 dominieren Picocyanobakterien und Chlorophyceen das ganze Jahr über das Phytoplankton (Schumann und Karsten 2006; Schumann et al. 2009; Albrecht et al. 2017). In den 90er Jahren wurden die Nährstoffeinträge in die Bodden deutlich reduziert (Baudler 2004; Bachor 2005). Die Zusammensetzung und Biomasse des Phytoplanktons sowie die Wassertrübung haben sich seither nicht wesentlich verändert (LUNG 2013; Albrecht et al. 2017). Nur die sehr hohen pH-Werte von bis zu 11, verursacht durch die hohe Photosyntheseleistung im Gewässer, und die extremen Chlorophyllmaxima haben sich deutlich verringert (Schumann und Karsten 2006). Nach wie vor ist die Darß-Zingster Boddenkette in einem unbefriedigenden bis schlechten ökologischen Zustand (LUNG 2013).

## 2.2 Probenahme

Für die Beprobung der Ostseeküste der Mecklenburger Bucht wurde die Seebrücke bei Heiligendamm gewählt (N54°08'46.46''; E11°50'36.03''; Abb. 2.1 b). Diese liegt in der Mecklenburger Bucht zwischen Rostock und Wismar. Wasserproben wurden am Ende der 200 m langen Seebrücke Heiligendamms entnommen. Die Probenahmestelle der Warnow befand sich am Ende der Oberwarnow, 200 m hinter der kommunalen Trinkwasserentnahmestelle der Stadt Rostock, direkt neben der dortigen Eisenbahnbrücke Kassebohm (N54°04'40.66''; E12°09'16.10''; Abb. 2.1 c). Hier wurden vom Ufer aus von einem erhöhten Steg die Wasserproben entnommen. Die Darß-Zingster Boddenkette wurde am Zingster Strom beprobt (N54° 25'46.47''; E12°41'13.81''; Abb. 2.1 d). Hier wurden die Wasserproben von einem Holzsteg, der circa 10 m in den Strom hineinreicht, genommen.

An den drei Probenahmestandorten Ostsee, Warnow und Zingster Strom wurden von Juli 2015 bis April 2017 bzw. für den Zingster Strom bis Juli 2017 alle drei bis vier Wochen

Oberflächenwasser (0,2 m Tiefe) mit einem 5 l Eimer entnommen und in vorgespülte Plastikkanister überführt. Gelagert wurden die Proben bei 15°C im Dunkeln. Innerhalb von fünf Stunden wurden die abiotischen und biotischen Parameter gemessen bzw. dafür Proben, Filter und Filtrate eingefroren (-20°C). Die AlkPA und PepA wurden spätestens am nächsten Tag gemessen.

## 2.3 Bestimmung der abiotischen Parameter

### 2.3.1 Temperatur, pH-Wert und Salinität

Bei der Beprobung der Ostseeküste und der Warnow wurde die Temperatur und Salinität (HQ40D Portables 2-Kanal Multimeter mit CDC401 LF-Elektrode, Hach Lange GmbH, Deutschland) während der Probenahme vor Ort gemessen. Der pH-Wert wurde spätestens drei Stunden später im Labor bestimmt (Zweikanal-Messgerät Seven Multi<sup>TM</sup> mit pH Elektrode InLab®Expert Pro, Mettler Toledo AG, Schweiz). Bei der Beprobung des Zingster Stroms wurden die Salinität (WTW Cond1970i) und der pH-Wert (Hach-Lange) wenige Minuten nach der Probenahme im Labor gemessen. Die Wassertemperatur wurde an einem Thermometer abgelesen, welches dauerhaft im Wasser positioniert ist.

### 2.3.2 Nährstoffe

Für die Messung der gelösten anorganischen Nährstoffe, wie Phosphat (DIP), Nitrat, Nitrit und Ammonium, und des gelösten Phosphorgehalts (DP) wurden 150 ml einer Wasserprobe pro Gewässertyp durch Celluloseacetat Filtermembranen (0,45 µm Porengröße, Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) filtriert. Die Zingster Strom Wasserproben wurden zuvor durch GF92 Glasfaservorfilter (Whatman GmbH, Deutschland) vorfiltriert. Die Filtrate wurden bis zur Nährstoffbestimmung bei -20°C gelagert. Für die Bestimmung des Gesamtphosphorgehaltes (TP) wurden 50 ml einer Vollprobe bis zur Messung ebenfalls bei -20°C gelagert.

Der DIP-Gehalt wurde mit dem Molybdänblaunachweis nach Murphy und Riley (1962) ermittelt. Das Produkt der Molybdänblaunachweis-Reaktion, das Molybdänblau, wurde mit einem kontinuierlichen Durchfluss-Analysegerät (CFA, Alliance Instruments GmbH, Schweiz; Malcolm-Lawes und Wong 1990) in einer 5 cm Küvette photometrisch gemessen.



Bei der DP- und TP-Bestimmung wurden die verschiedenen P-Verbindungen in Phosphat und ihre restlichen Bestandteile durch eine Aufschlussmethode nach Huang und Zhang (2009) aufgespalten. Dafür wurden 15 ml Probe mit 1,5 ml basischer Persulfatlösung versetzt und bei 90°C für 24 Stunden in Gefäßen aus Perfluoralkoxypolymer inkubiert. Die Probe wurde anschließend mit dem Indikatorfarbstoff Nitrophenol und 1N HCl Lösung neutralisiert und bei -20°C bis zur Phosphatmessung gelagert. Pro Probe wurden zwei Messreplikate aufgeschlossen und gemessen. Durch die Subtraktion des DIP von DP wurde der DOP-Gehalt berechnet. Der partikuläre P-Gehalt (PP) wurde bestimmt durch TP minus DP.

Die Bestandteile des DIN, d. h. die Ammonium-, Nitrat- und Nitritkonzentrationen, wurden mit einem kontinuierlichen Durchfluss-Analysegerät (CFA, Alliance Instruments GmbH, Schweiz; Malcolm-Lawes und Wong 1990) in einer 5 cm Küvette photometrisch gemessen (Deutsche Industrienorm 13395\_1996 und 11732\_2005). Der DIN entspricht der molaren Summe von Ammonium, Nitrat und Nitrit. Die DIN:DIP-Verhältnisse wurden entsprechend den Mol-Verhältnissen kalkuliert. Alle DIP-Werte die 0  $\mu\text{mol l}^{-1}$  entsprachen wurden dafür zuvor durch die Nachweisgrenze von 0,05  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (Tabelle A2) ersetzt.

## 2.4 Bestimmung der biotischen Parameter

### 2.4.1 Chlorophyll *a*-Gehalt

Zur Bestimmung des Gehalts an Chlorophyll *a* (Chl *a*) in den einzelnen Gewässern wurde eine definierte Menge einer Wasserprobe (Ostsee: 400 – 4000 ml; Warnow: 250 – 450 ml; Zingster Strom: 15-35 ml) auf einen GF6 Glasfaserfilter (Whatman GmbH, Deutschland) filtriert und bei -20°C gelagert. Das Einfrieren bricht die Algenzellen auf und verbessert den Extraktionsprozess. Für die Chl *a*-Extraktion wurde der Filter gemörsert und nach der Zugabe einer Spatelspitze Magnesiumcarbonat (Verhindert den Chlorophyllabbau) mit 7 oder 10 ml Ethanol überschichtet und 24 Stunden bei 6°C im Dunkeln inkubiert. Um den Filter vom Extrakt zu separieren, wurde das Gemisch nach der Inkubationszeit bei 5000 U min<sup>-1</sup> für zehn Minuten zentrifugiert. Der Extrakt wurde in eine 5 cm Küvette überführt. Mit dem Photometer (DR 3900, Hach-Lange GmbH, Düsseldorf) wurde die Extinktion bei 665 nm (Pigmentabsorption) und 750 nm (Trübungsblindwert) gemessen (Deutsche Industrienorm 38412\_1985). Der Chl *a*-Gehalt in  $\mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$  wurde mit Gleichung 1 berechnet. Pro Gewässerprobe wurden drei Messreplikate hergestellt und gemessen. Daraus wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Gleichung 1:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g l}^{-1}\text{)} = \frac{(E_{665} - E_{750}) \times \text{Extraktionsvolumen (ml)} \times 10^6}{83 \text{ (Extinktionskoeffizient)} \times \text{filtriertes Probevolumen (ml)} \times \text{Länge der Messküvette (cm)}}$$

#### 2.4.2 Bakterienabundanz

Zur Bestimmung der Bakterienabundanz in den einzelnen Gewässern wurden jeweils 20 ml einer Wasserprobe mit 1 ml 25%igem Glutaraldehyd fixiert (1,2%ige Endkonzentration) und im Dunkeln gelagert. Von dieser fixierten Probe wurden 5 ml (Ostseeküste), 1 ml (Warnow) bzw. 0,5 ml (Zingster Strom) auf einen schwarz gefärbten (24 h mit Irgalanswarz eingefärbt) Polycarbonatfilter (Polycarbonat Track-Etched-Membranfilter Typ 23007, 0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland) filtriert. Auf die filtrierte Probe wurden 12 Tropfen einer steril filtrierten (Spritzenvorsatzfilter, Puradisc<sup>TM</sup> FP30 0,2 CA-S, Whatman GmbH, Deutschland) DAPI-Lösung (4,6-diamino-2-phenylindol) gegeben und fünf Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die DAPI Lösung abfiltriert. Der Probefilter wurde mit einem Tropfen Immersionsöl auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Tropfen Immersionsöl und einem Deckglas bedeckt. Diese Probe wurde bis zur Auszählung (maximal eine Stunde) im Dunkeln gelagert. Zur Bestimmung der Bakterienabundanz wurde die Anzahl der Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop (BX51 TF, Olympus Optical Co LTD, Japan mit Olympus U-RFL-T Brenner) mit dem 100er Objektiv unter UV-Anregung ausgezählt (Mindestens 400 Zellen pro Filter). Die Bakterienabundanz wurde mit der Gleichung 2 berechnet.

Gleichung 2:

$$\text{Bakterienabundanz (10}^6\text{ Zellen ml}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Gezählte Zellen} \times \text{Filterflächenkorrektur} \times \text{Verdünnungskorrektur} \times \text{Teilflächenkorrektur}}{\text{Filtriertes Probevolumen (ml)} \times \text{Anzahl der ausgezählten Gesichtsfelder}}$$

Der Faktor des Epifluoreszenzmikroskop für das 100er Objektiv entspricht 0,03464 (Filterfläche 346,4  $\text{mm}^2$ ; Zählraster Fläche 10.000  $\mu\text{m}^2$ ). Die Verdünnungskorrektur ergibt sich aus dem Fixierungsschritt (1 ml Glutaraldehyd auf 20 ml Probe = 1,05). Die Teilflächenkorrektur (ganzes Gesichtsfeld = 1, halbes Gesichtsfeld = 2, 10 Felder = 10) ergibt sich aus der Differenz der Gesamtanzahl der Felder (Zählraster: 10 x 10 Felder = 100 Felder) und der Anzahl der ausgezählten Felder.

### 2.4.3 Seston

Der Sestongehalt bzw. das suspendierte partikuläre Material, bestehend aus anorganischen und organischen Partikeln, wurde in allen drei Gewässern bestimmt (Deutsche Industrienorm 38409 H2-2). Dafür wurde eine definierte Menge einer Wasserprobe (Ostsee: 400 – 4000 ml; Warnow: 250 – 450 ml; Zingster Strom: 15 – 35 ml) auf GF6 Filter (Glasfaserfilter) filtriert. Die GF6 Filter wurden vor der Nutzung bei 450°C für vier Stunden im Muffelofen ausgeglüht (LE6/11/B150, Nabertherm GmbH, Deutschland) um vorhandene C- und N-haltige Partikel für die darauffolgende POC- und PN (partikulärer Stickstoff)-Bestimmung zu entfernen. Nach dem Abkühlen in einem Exsikkator wurden die Filter gewogen (Mikrowaage, MC210P, Sartorius AG, Deutschland) und zur Filtration der Wasserproben benutzt. Die Sestonfilter wurden anschließend für 24 Stunden bei 60°C getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und wieder gewogen. Der Sestongehalt in  $\text{mg l}^{-1}$  wurde gemäß Gleichung 3 berechnet. Pro Gewässerprobe wurden drei Messreplikate angefertigt. Aus den Messreplikaten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Gleichung 3:

$$\text{Seston (mg l}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Filter}_{\text{Probe}} \text{ (mg)} - \text{Filter}_{\text{leer}} \text{ (mg)})}{\text{Filtriertes Probevolumen (l)}}$$

### 2.4.4 Partikuläres organisches Material

Zur Bestimmung des POM (Plankton und Detritus) wurden die Sestonfilter (siehe 2.4.3) im Muffelofen (LE6/11/B150, Nabertherm GmbH, Deutschland) bei 450°C für vier Stunden ge- glüht und die verbleibende Asche mit dem Filter, nach dem Abkühlen im Exsikkator, gewogen. Der POM-Gehalt wurde nach Gleichung 4 bestimmt. Pro Gewässerprobe wurden drei Mess- replikate hergestellt und gewogen, aus denen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurden.

Gleichung 4:

$$\text{POM (mg l}^{-1}\text{)} = \text{Seston (mg l}^{-1}\text{)} - \frac{(\text{Filter}_{\text{Asche}} \text{ (mg)} - \text{Filter}_{\text{leer}} \text{ (mg)})}{\text{Filtriertes Probevolumen (l)}}$$

## 2.4.5 Partikulärer organischer Kohlenstoff und partikulärer Stickstoff

Für die Bestimmung des POC und PN wurden Sestonfilter (siehe 2.4.3) 24 Stunden im Exsikkator in einer Chlorwasserstoff-Atmosphäre (37%ige HCl-Lösung) inkubiert, um den anorganischen C-Anteil als Kohlendioxid zu entfernen. Danach wurden die Sestonfilter für zwei Stunden bei 60°C erneut getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und in Zinnschiffchen (9x10x20 mm, IVA Analysentechnik e.K., Deutschland) verpackt. Diese gepackten Zinnpäckchen wurden zu festen Pellets gepresst, um Verunreinigung durch Luftstickstoff gering zu halten. Im CN-Elementanalysator (varioEl III, Elementar Analysensysteme GmbH, Deutschland) wurden die Proben gemessen (Sauerstoff als Verbrennungsgas im Index 1, Helium als Trägergas, Verbrennungsrohr: 950°C, Reduktionsrohr 500°C, circa 5 mg Acetanilid [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland] als Standard). Als Ausgabe erhält man den POC- und PN-Gehalt in mg, welcher durch das filtrierte Probenvolumen dividiert wurde und als mg POC bzw. PN l<sup>-1</sup> dargestellt wurde. Pro Gewässerprobe wurden drei Messreplikate hergestellt und damit Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Die POC:PN-Verhältnisse wurden entsprechend den Mol-Verhältnissen berechnet.

## 2.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten

### 2.5.1 Alkaline Phosphataseaktivität

Die AlkPA kann durch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) und die Michaeliskonstante ( $K_M$ ) beschrieben werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit ( $V$ ; mol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) entspricht der Stoffmenge eines Substrats, die in einem bestimmten Reaktionsvolumen pro Zeiteinheit von den Enzymen umgesetzt wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Enzym- und Substratkonzentration sowie von der Temperatur, dem pH-Wert, der Ionenstärke und der Konzentration verschiedener Metallionen (Bergmeyer und Gawehn 1977; McComb et al. 1979; Jansson et al. 1988). Die AlkPA zeigt eine hyperbolische Sättigungskurve (Abb. 2.2), die mit der Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 5) beschrieben werden kann (Hoppe 2003).

Gleichung 5:

$$V = \frac{V_{\max} \times \text{Substratkonzentration}}{K_M + \text{Substratkonzentration}}$$

Dabei steigt mit steigender Substratkonzentration auch die Reaktionsgeschwindigkeit, da die Wahrscheinlichkeit, dass ein Enzym auf ein Substratmolekül trifft, erhöht wird. Wenn eine weitere Zunahme der Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit nicht weiter erhöht, sind alle Enzyme mit Substrat gesättigt und arbeiten mit ihrer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. Wenn die AlkPA unter einer konstanten Temperatur und pH-Wert gemessen wird, ist  $V_{\max}$  äquivalent zu der Menge der vorhandenen Enzyme. Der  $K_M$  entspricht der Substratkonzentration, bei der die Hälfte von  $V_{\max}$  erreicht ist. Der  $K_M$  ist von der Substratstruktur, der Temperatur und dem pH-Wert abhängig. Bei konstanter Temperatur und pH-Wert kann mithilfe des  $K_M$  eine Aussage über die Affinität des Enzyms zu dem vorhandenen Substrat getroffen werden (Jansson et al. 1988). Bei einem kleinen  $K_M$ -Wert wird schon bei einer geringen Substratkonzentration eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Damit ist die Affinität des Enzyms zu dem vorhandenen Substrat hoch. Bei einem hohen  $K_M$ -Wert ist die Affinität des Enzyms zu dem Substrat gering.

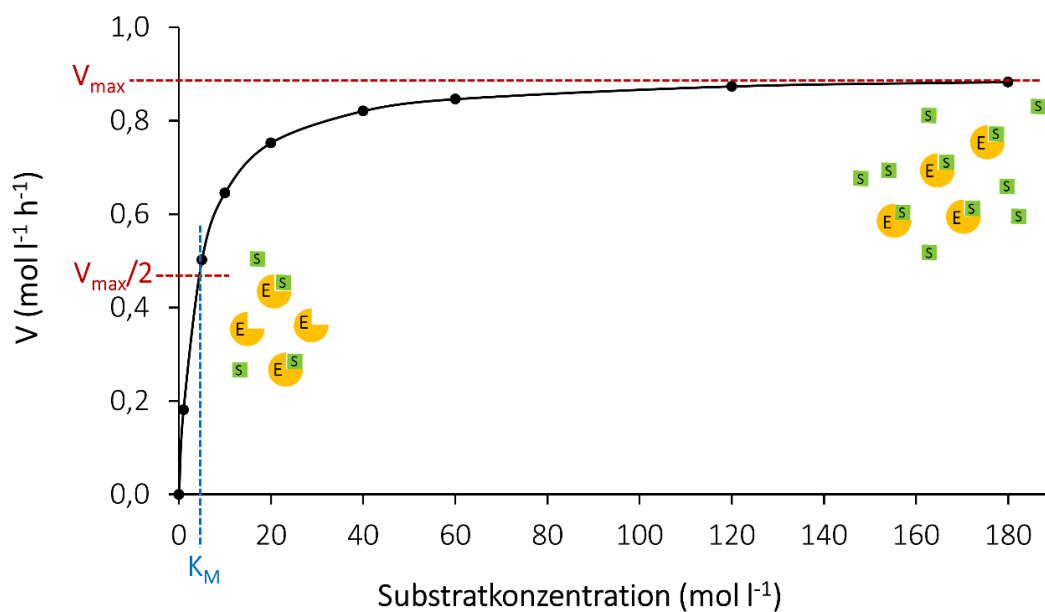


Abb. 2.2: Der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit ( $V$ ; mol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; schwarze durchgängige Linie) der alkalischen Phosphataseaktivität mit steigender Substratkonzentration (mol l<sup>-1</sup>). Wenn alle Enzyme (E; orange Kugeln) mit Substrat (S; grüne Quadrate) gesättigt sind, ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) erreicht. Die Substratkonzentration, bei der die Hälfte von  $V_{\max}$  erreicht ist, entspricht der Michaeliskonstante ( $K_M$ )

Zur Bestimmung der AlkPA in den Wasserproben wurde das Substrat MUF-P nach der Methode von Hoppe (1983, 1993) benutzt. Die zu bestimmenden AlkP<sub>asen</sub> in einer Wasserprobe spalten die Esterbindung zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff Methylumbelliferon (MUF) und

dem Phosphat. Vor der enzymatischen Hydrolyse fluoresziert das Substrat MUF-P nicht. Erst nach der Phosphatabspaltung zeigt das MUF bei einer Anregung von 365 nm eine Fluoreszenz bei 451 nm.

Für die Differenzierung der AlkPA in einen Partikel-gebundenen und extrazellulären, frei gelösten Anteil, wurde die AlkPA in der Vollprobe und in einer steril filtrierten Wasserprobe (Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm Porengröße, Puradisc<sup>TM</sup> FP 30 CA-S, Whatman GmbH, Deutschland) gemessen. Die Zingster Strom-Proben wurden vorfiltriert mit GF92 Glasfaservorfilter (Whatman GmbH, Deutschland). Die AlkPA in der steril filtrierten Wasserprobe entspricht dem extrazellulären, frei gelösten Anteil. Im Folgenden wird dieser Anteil als gelöste AlkPA bezeichnet. Die AlkPA der Vollprobe minus der steril filtrierten Wasserprobe entspricht der Partikel-gebundenen AlkPA. Dieser Anteil wird im Folgenden als partikuläre AlkPA bezeichnet.

Zur Berechnung vom  $V_{\max}$  und  $K_M$  wurde die AlkPA bei den Substratkonzentrationen 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 180 und 250 µmol l<sup>-1</sup> bestimmt. Substratkonzentrationen zwischen 60 und 100 µmol l<sup>-1</sup> reichten meist aus, um die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Mit weiter steigenden Substratkonzentrationen blieb die AlkPA konstant und sank nicht ab, wie bei Sebastián und Niell (2004) beschrieben. Ab Oktober 2016 wurden die zwölf Substratkonzentrationen daher auf acht reduziert (1, 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180 µmol l<sup>-1</sup>).

Blindwerte aus Reinstwasser (< 0,05 µS cm<sup>-1</sup>) wurden wie die Wasserproben behandelt, um diese für eine nicht enzymatische Hydrolyse zu korrigieren. Die Proben wurden mit einem TRIS/TRIS-HCL-Puffer (3,54 g TRIS-HCL + 3,34 g TRIS Base pro Liter Reinstwasser; pH mit 1N HCL und 1N NaOH auf pH 8,2 eingestellt) auf einen pH von 8,2 abgepuffert (5 mM Endkonzentration). Zur AlkPA-Messung wurden 2 ml einer Probe in eine 24-Well-Platte überführt. Für jede Probe und die Blindwerte wurden drei Messreplikate hergestellt. Die Fluoreszenz wurde sofort nach der Zugabe von 40 µl Substratlösung und alle 30 Minuten über insgesamt zwei bis drei Stunden hinweg mit einem Mikroplattenreader (SpectraMax M2<sup>e</sup>, Molecular Devices GmbH, Deutschland) gemessen (Einstellungen: Fluoreszenz; Ex: 365 nm, Em: 451 nm; Top read; 24-Well Std clrbtm; AutoCutoff: bei 435 nm; PMT Sensitivity: niedrig; Automix: fünf Sekunden; Carriage Speed: normal). Zwischen den Messungen wurden die 24-Well-Platten im Dunkeln bei einer Temperatur von 22°C gelagert.

Die Substratlösungen wurden für die AlkPA-Bestimmungen meist neu hergestellt und maximal drei Wochen im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Zu jeder Messung wurde eine neunstufige geometrische Verdünnungsreihe von 0,05 bis 25 µmol l<sup>-1</sup> des Produkts MUF hergestellt

und deren Fluoreszenz gemessen. Die Kalibriergeraden waren immer linear mit einem Bestimmtheitsmaß  $> 0,996$ . Aus der Fluoreszenz für jede Produktkonzentration wurde ein Kalibrierfaktor berechnet (Gleichung 6), mit dem die relativen Fluoreszenzeinheiten in Konzentrationen umgerechnet wurden. Aus dem Anstieg des Fluoreszenzsignals über die Zeit und dem Kalibrierfaktor wurde  $V$  der enzymatischen Spaltung in  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für jede Substratkonzentration berechnet (Gleichung 7). Die Zugabe des TRIS/TRIS-HCL-Puffer und der Substratlösung wurden durch Verdünnungsfaktoren herausgerechnet.

Gleichung 6:

$$\text{Kalibrierfaktor} = \text{Steigung (Fluoreszenz; Konzentration)}$$

Gleichung 7:

$$V (\mu\text{mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{Steigung (Fluoreszenz; Zeit)} \times \text{Kalibrierfaktor} \\ \times 60 (\text{Umrechnung auf h}) \times \text{Verdünnungskorrektur} \\ \text{Puffer} \times \text{Verdünnungskorrektur Substrat}$$

Aus den drei Messreplikaten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Der Blindwert-Mittelwert wurden jeweils von dem Vollproben- und Filtrat-Mittelwert subtrahiert. Die Standardabweichung wurde mit der Fehlerfortpflanzung (nach Doerffel) korrigiert. Zur Berechnung der partikulären AlkPA wurde der Filtrat-Mittelwert von dem Vollproben-Mittelwert subtrahiert.

Zur Berechnung von  $V_{\text{max}}$  und  $K_M$  wurde die Methode der kleinsten Quadrate (KQ Methode) genutzt. Hierbei wird eine theoretische Kurve gesucht ( $V_{\text{Theor}}$ ), die am besten die gemessenen Datenpunkte ( $V_{\text{Kalk}}$ ) beschreibt (Abb. 2.3). Da die Enzymreaktion mit der Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden kann, wurde die Michaelis-Menten-Gleichung für die Berechnung von  $V_{\text{Theor}}$  verwendet (Gleichung 8). Zunächst wurden Schätzwerte für  $V_{\text{max}}$  und  $K_M$  gewählt und damit  $V_{\text{Theor}}$  bei den verschiedenen Substratkonzentrationen berechnet. Die vertikale Differenz zwischen  $V_{\text{Theor}}$  und  $V_{\text{Kalk}}$  ergibt das sogenannte Residuum (Abweichung des mathematischen Modelwerts vom tatsächlichen Wert). Alle Residuen wurden addiert und, damit negative und positive Residuen sich nicht gegenseitig wegkürzen, quadriert (Gleichung 9). Mit der Solver Funktion (Excel; Lösungsmethode: GRG-Nichtlinear) wurden die Parameter  $V_{\text{max}}$  und  $K_M$  so gewählt, dass die Summe der quadratischen Residuen, dividiert durch  $V_{\text{Theor}}$ , minimiert wurde (Gleichung 9). Die ausgegebenen optimierten  $V_{\text{max}}$  und  $K_M$  beschreiben die gemessenen Datenpunkte bestmöglich.

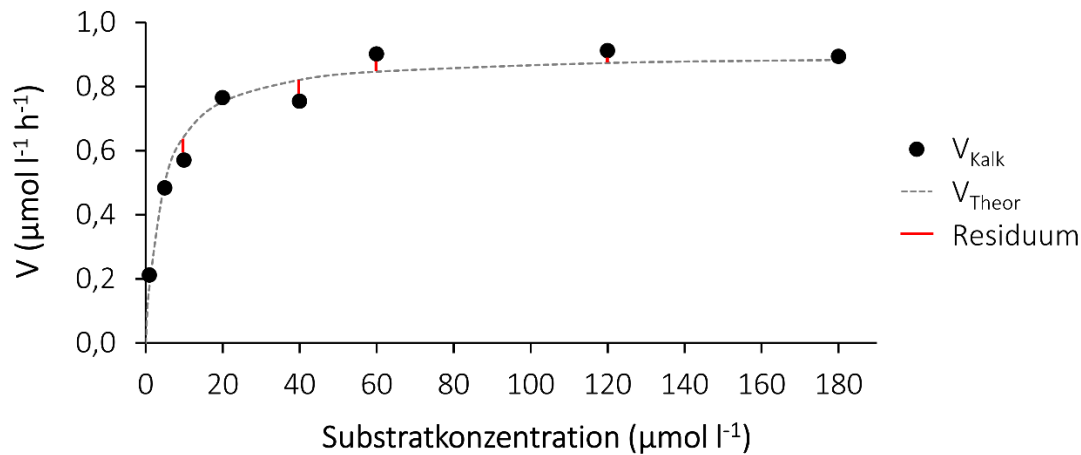


Abb. 2.3: Die Darstellung der theoretischen Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\text{Theor}}$ ;  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; gestrichelte graue Linie) der alkalinen Phosphataseaktivität, berechnet mit der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\text{Kalk}}$ ;  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; schwarze Punkte), der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 8) und der KQ-Methode (Gleichung 9); Residuum = vertikale Differenz zwischen  $V_{\text{Kalk}}$  und  $V_{\text{Theor}}$

Gleichung 8:

$$V_{\text{Theor}} = \frac{\text{Schätzwert für } V_{\text{max}} \times \text{Substratkonzentration}}{\text{Schätzwert für } K_{\text{M}} + \text{Substratkonzentration}}$$

Gleichung 9:

$$\text{Minimieren der } \sum_{k=1}^{180} \frac{((k_{V_{\text{Theor}}} - k_{V_{\text{Kalk}}})^2)}{k_{V_{\text{Theor}}}}$$

Zur Darstellung von Jahresgängen wurde die partikuläre AlkPA der drei untersuchten Gewässer mit dem PP-Gehalt normiert, da sich diese Normierung als am geeignetsten erwiesen hatte, um die partikuläre AlkPA zu interpretieren. Die partikuläre AlkPA wurde zusätzlich mit anderen Biomasseparametern normiert. Damit wurde der Einfluss des Normierungsparameters auf die Interpretation der partikuläre AlkPA untersucht.

Um den Ursprung der AlkPA gewissen Organismengruppen zuzuordnen, wurden für die Ostsee und Warnow im Winter (Dez. 2016) und Frühjahr (Apr. bzw. Mrz. 2017) und für den Zingster Strom vom Winter bis Sommer (Dez. 2016 – Jul. 2017) größenfraktionierte AlkPA-Messungen durchgeführt. Dafür wurden die Gewässerproben durch verschiedene Filter nacheinander filtriert und so die jeweiligen Größenfraktionen voneinander getrennt. Die Wasserproben der Ostsee und Warnow wurden durch Filter mit einer Porengröße von 50  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  und 0,2  $\mu\text{m}$  (HYDRO-BIOS, Kiel und Spritzenvorsatzfilter, Puradisc<sup>TM</sup> FP30 0,2 CA-S, Whatman



GmbH, Deutschland) gefiltert. Die Zingster Strom-Wasserproben wurde durch Filter mit 20  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  und 0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße gefiltert. Die AlkPA wurde bei acht verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt und  $V_{\text{max}}$  und  $K_M$  berechnet (siehe oben). Durch die Subtraktion der Reaktionsgeschwindigkeit der verschiedenen Filtrate voneinander, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit für die verschiedenen Größenklassen errechnet (Ostsee und Warnow: < 0,2  $\mu\text{m}$ ; 0,2 – 1 $\mu\text{m}$ ; 1 – 20 $\mu\text{m}$ ; 20 – 50 $\mu\text{m}$ ; > 50 $\mu\text{m}$ ; Zingster Strom: < 0,2  $\mu\text{m}$ ; 0,2 – 1 $\mu\text{m}$ ; 1 – 5 $\mu\text{m}$ ; 5 – 10 $\mu\text{m}$ ; 10 – 20 $\mu\text{m}$ ; > 20 $\mu\text{m}$ ) und auch davon  $V_{\text{max}}$  und  $K_M$  bestimmt. Dargestellt wurden die Enzymaktivitäten der verschiedenen Größenfraktionen in Prozent von der Gesamtzymaktivität.

Um den Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes während der AlkPA-Messung auf  $V_{\text{max}}$  und  $K_M$  zu untersuchen, wurden im Februar und November 2016 (24.02.16 und 16.11.16) mit natürlichen Zingster Strom-Proben AlkPA-Messungen unter vier Temperaturen (6, 14, 22 und 30°C) und fünf pH-Werten (pH 7,2, 7,7, 8,2, 8,6 und 8,9) durchgeführt. Der pH-Wert wurde bei dem Temperaturexperiment bei 8,2 gehalten. Bei dem pH-Experiment wurde die Temperatur konstant bei 22°C gehalten. Für die pH-Stufen wurden verschiedene TRIS/TRIS-HCL-Puffer und MUF-Stammlösungen mit dem entsprechenden pH-Wert hergestellt. Die Proben wurden vor dem Messbeginn für mindestens eine Stunde in der jeweiligen Temperaturstufe akklimatisiert und zwischen den Messungen bei der jeweiligen Temperatur im Dunkeln inkubiert.

### 2.5.2 Amino-peptidaseaktivität

Die Amino-peptidaseaktivität (PepA) wurde in gleicher Weise wie die AlkPA gemessen und berechnet (Hoppe 1983; Hoppe 1993), jedoch mit dem Substrat *L*-Leucine-4-methylcoumarinyl-7-amid (Leu-MCA), das unter Abspaltung der Aminosäure Leucin als 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) fluoresziert und bei den gleichen Wellenlängen wie das MUF gemessen wurde (SpectraMax M2<sup>e</sup>, Molecular Devices GmbH, Deutschland; Fluoreszenz; Ex: 365 nm, Em: 451 nm; Top read; 24-Well Std clrbtm; AutoCutoff: bei 435 nm; PMT Sensitivity: niedrig; Automix: 5 Sek.; Carriage Speed: normal). Im Gegensatz zur AlkPA wurden die PepA nur bei einer Substratkonzentration von 400  $\mu\text{mol l}^{-1}$  bestimmt und daher keinen  $V_{\text{max}}$  oder  $K_M$  berechnet. Bei einer Substratkonzentration von 400  $\mu\text{mol l}^{-1}$  misst man im Sättigungsbereich und erhält einen  $V_{\text{max}}$  äquivalenten Wert (Hoppe 1993). Auch hier wurde die PepA in einer Vollprobe und einer steril filtrierten Wasserprobe (Spritzenvorsatzfilter, Puradisc<sup>TM</sup> FP30, 0,2 CA-S, Whatman GmbH, Deutschland) gemessen und aus der Differenz der Aktivitäten die

partikuläre PepA ermittelt. Da die PepA hauptsächlich von Bakterien gebildet wird, wurde sie über die Gesamtbakterienabundanz normiert und hat die Einheit fmol Bakterienzelle<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Die PepA wurde für die Ostsee und Warnow im Frühjahr (Apr. bzw. Mrz. 2017) und für den Zingster Strom vom Frühjahr bis Sommer (Mrz. – Jul. 2017) größenfraktioniert, mit den gleichen Filtern wie für die AlkPA, gemessen (siehe 2.5.1).

## 2.6 Nährstoffexperimente mit natürlichen Zingster Strom-Planktonproben

Vom Frühlingsanfang bis zum Sommer des Jahres 2017 wurde regelmäßig der Zingster Strom beprobt (2.3, 7.3, 21.3, 3.4, 19.4, 8.5, 29.5 und 11.7.2017; Standort und Durchführung siehe 2.2). Direkt nach der Probenahme wurden folgende Parameter bestimmt: Temperatur, pH, Salinität, Chl *a*, Seston, DIN, DIP, POC und PN. Spätestens 24 Stunden nach der Probenahme (Lagerung bei 15°C im Dunkeln) wurde die AlkPA (drei Messreplikate, Vollprobe, Kinetikparameter  $V_{\max}$  und  $K_M$ ) und PepA (drei Messreplikate, Vollprobe) gemessen. Es wurden mindestens 10 l in ein großes Probengefäß überführt und unter ständigem Rühren (Rührfisch und Magnetrührer) jeweils 2 l Probe in vier bzw. fünf Steilbrustflaschen überführt, welche zuvor mit dem Probewasser gespült wurden. Diese 2 l Proben wurden mit verschiedenen Nährstoffen in mehreren Mischverhältnissen wie folgt gedüngt:

- +N Behandlung: 2 ml einer 75 mM Kaliumnitrat Lösung – Endkonzentration 75 µM
- +P Behandlung: 2 ml einer 5 mM Natriumhydrogenphosphat Lösung – Endkonzentration 5 µM
- +NP 15:1 Behandlung: 2 ml einer 75 mM Kaliumnitrat Lösung und 2 ml einer 5 mM Natriumhydrogenphosphat Lösung – Endkonzentration 75 µM Nitrat und 5 µM Phosphat; Nitrat zu Phosphat-Verhältnis 15:1
- +NP 4:1 Behandlung: 2 ml einer 75 mM Kaliumnitrat Lösung und 8 ml einer 5 mM Natriumhydrogenphosphat Lösung – Endkonzentration 75 µM Nitrat und 20 µM Phosphat; Nitrat zu Phosphat-Verhältnis 4:1

Ein fünftes Probengefäß wurde an zwei Probenahmezeitpunkten (19.4 und 11.7) nicht mit Nährstoffen angereichert und als Kontrolle mitgeführt. Die Proben wurden nach der Nährstoffzugabe in einen Klimaraum überführt, der über den gesamten Experimentzeitraum eine Temperatur von 17°C ± 1°C aufwies. Die Proben wurden mit Halogenleuchten bestrahlt mit einer Photonflussdichte von 58 bis 85 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> in einem 16:8 Licht-Dunkel Rhythmus. Täglich wurden die Proben geschwenkt. Genau 24 Stunden und sieben Tage nach der

Nährstoffzugabe wurden jeweils 1 l aus dem Probegefäß entnommen und damit folgende Parameter bestimmt: AlkPA (Vollprobe, Kinetikparameter  $V_{\max}$  und  $K_M$ ), PepA (Vollprobe), Chl *a*, Seston, POC, PN, DIN und DIP. Die Veränderung der Biomasse (Chl *a*- und POC-Gehalt) über die Zeit wurde angegeben in % vom Ausgangswert (Wert vor der Nährstoffzugabe).

## 2.7 Qualitätssicherung

Für die Nährstoffparameter (DIP, TP, DP, Ammonium, Nitrat und Nitrit) sowie für die Enzymaktivitäten (AlkPA und PepA) wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt (Tabelle A2). Dafür wurden nach der Leerwertmethode zehn Blindwerte (Reinstwasser  $< 0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) gemessen (Deutsche Industrienorm 32645). Bei jeder Messung der Nährstoffparameter und der Enzymaktivitäten wurden neben den Proben zusätzlich drei Blindwerte (Reinstwasser  $< 0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) mitgemessen. Die Blindwerte mit den jeweiligen Bestimmungs- und Nachweisgrenzen wurden in Blindwert-Zielkarten grafisch aufgetragen (DIP: Abb. A1; TP und DP: Abb. A2; Ammonium, Nitrit und Nitrat: Abb. A3; AlkPA: Abb. A4; PepA: Abb. A5). Bei den Messungen der Nährstoffparameter (DIP, TP, DP, Ammonium, Nitrat und Nitrit) wurden Standards als Referenzwerte mit gemessen. Hierbei diente eine  $5 \mu\text{M}$  Kaliumhydrogenphosphat-Lösung als DIP-Standard, eine  $5 \mu\text{M}$  Diphenylphosphat-Lösung als TP- bzw. DP-Standard und verschiedene Konzentrationen von Ammoniumchlorid- bzw. Natriumnitrit-Lösungen als Ammonium bzw. Nitrit- und Nitrat-Standard. Die Standardwerte wurden in Sollwert-Zielkarten mit dem Referenzwert (Soll-Konzentration des Standards) und einer oberen bzw. unteren Warn- ( $\pm 10\%$  des Referenzwertes) und Eingriffsgrenze ( $\pm 15\%$  des Referenzwertes) grafisch dargestellt (DIP: Abb. A6; TP und DP: Abb. A7; Ammonium, Nitrit und Nitrat: Abb. A8). Bei jeder Enzymaktivitätsmessung wurden Kalibriergeraden für die Produkte MUF und AMC frisch aus den Stammlösungen hergestellt und gemessen. Die Bestimmtheitsmaße der Kalibriergeraden lagen immer über 0,996. Mit den Kalibrierfaktoren wurden Regelkarten gemäß Hovind et al. (2011) angefertigt (AlkPA: Abb. A9; PepA: Abb. A10). Dabei wurden die Kalibrierfaktoren mit einem Referenzwert (Mittelwert aller gemessener Kalibrierfaktoren) und einer oberen bzw. unteren Warn- ( $\pm 2 \times$  Standardabweichung aller gemessener Kalibrierfaktoren) und Eingriffsgrenze ( $\pm 3 \times$  Standardabweichung aller gemessener Kalibrierfaktoren) aufgetragen. Es wurden Spannweiten-Regelkarten für die Nährstoffparameter (DIN: Abb. A11; TP und DP: Abb. A12; Ammonium: Abb. A13; Nitrit: Abb. A14; Nitrat: Abb. A15), Enzymaktivitäten (AlkPA: Abb. A16; PepA: Abb. A17) und Biomasseparameter (Chl *a*: Abb. A18; Seston: Abb. A19; POM: Abb. A20; POC: Abb. A21; PN: Abb. A22) angefertigt. Die Spannweiten entsprechen der

Differenz zwischen dem größten und kleinsten Einzelergebnis von zwei oder mehreren Analysen an derselben Probe. Die Spannweiten wurden in Prozent vom Mittelwert der Messreplikate angegeben. Gemäß Hovind et al. (2011) wurden obere Warn- (Standardabweichung der Spannweiten  $\times 2,833$  bei zwei Messreplikaten bzw.  $\times 3,470$  bei drei Messreplikaten) und Eingriffsgrenzen (Standardabweichung der Spannweiten  $\times 3,686$  bei zwei Messreplikaten bzw.  $\times 4,358$  bei drei Messreplikaten) ermittelt.

## 2.8 Statistik

Da die gemessenen abiotischen und biotischen Parameter sowie die Enzymaktivitäten der drei Gewässer nicht normalverteilt waren, wurde zur Darstellung von Durchschnittswerten der Median mit Minimum und Maximum gewählt. Dafür wurden alle Werte in dem gesamten Probenahmezeitraum berücksichtigt (Juli 2015 bis April 2017 für die Ostsee & Warnow bzw. Juli 2015 bis Juli 2017 für den Zingster Strom). Um signifikante Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gewässern zu detektieren, wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis Test (IBM SPSS Statistics 25) für unabhängige Stichproben gewählt. Zur Darstellung von Jahresgängen wurden nur die Daten zwischen Januar 2016 und Dezember 2016 gezeigt.

Für die Ermittlung von linearen Zusammenhängen zwischen zwei Parametern wurden zweiseitige Spearman-Rangkorrelationen mit dem Statistikprogramm SPSS (IBM SPSS Statistics 25) durchgeführt. Dafür wurden alle erhobenen Daten genutzt (Juli 2015 – Juli 2017). Da der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient einem parameterfreien Maß für Korrelationen entspricht, war die Normalverteilung der Daten und eine lineare Beziehung zwischen den Variablen keine Voraussetzung.

Um die Auswirkungen der Nährstoffzugaben auf die AlkPA zu bewerten, wurden gepaarte T-Tests mit dem Statistikprogramm SPSS (IBM SPSS Statistics 25) durchgeführt. Dafür wurde die Veränderung der AlkPA über die Zeit in Prozent vom Ausgangswert (Wert vor der Nährstoffzugabe) berechnet. Die acht Probenahmezeitpunkte zwischen März und Juli wurden als Replikate betrachtet. Die Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test und die Homogenität der Varianzen mit dem Levene's Test überprüft. Die Prozentwerte wurden zunächst Arcsin-Wurzel-transformiert. Wenn die Daten danach nicht normalverteilt und deren Varianzen nicht homogen waren, wurden die Daten so transformiert das beide Voraussetzungen zutrafen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die drei untersuchten Gewässer im Vergleich

##### 3.1.1 Allgemeine Merkmale

Gemäß dem Eutrophierungszustand der drei Gewässer nahm der Chl *a*-Gehalt als Biomasseparameter des Phytoplanktons, die Bakterienabundanz und der TP-Gehalt von der Ostsee über die Warnow zum Zingster Strom zu (Tabelle 3.1). Im Zingster Strom zeigten auch die hohen pH-Werte von im Sommer bis zu 9,4 den hohen Trophiestatus des Gewässers an.

Ein Chl *a*:Seston-Verhältnis in der Ostsee von meist  $< 2$  weist auf allochthon produziertes organisches Material hin oder auf einen hohen Anteil an anorganischen Partikeln im Seston. Tatsächlich war in der Ostsee der Anteil von anorganischem Material am Seston mit 35 bis 91% recht hoch. Ein Chl *a*:Seston-Verhältnis von  $> 2$ , welches auf frisches autochthon produziertes organisches Material schließen lässt, trat in der Ostsee nur während der Chl *a*-Maxima im Frühling und Herbst auf. Extrem hohe Sestonwerte, mit einem hohen Anteil von anorganischem Material, wurden vor allem in den Wintermonaten beobachtet. Diese wurden vermutlich von Winterstürmen verursacht, welche die Wassersäule umwälzen und abgelagerte anorganische Partikel wie Sand und Schluff an die Wasseroberfläche bringen. Das POC:PN-Verhältnis lag in der Ostsee meist nahe am Redfield-Verhältnis von 7:1. Das POC:PP-Verhältnis war meist  $< 106$ , das PN:PP-Verhältnis meist  $< 16$  und das PP:POM-Verhältnis meist  $> 0,32$  (Tabelle 3.1). Dies lässt auf eine gute P-Versorgung des Planktons schließen (Tabelle A1).

In der Warnow war das Chl *a*:Seston-Verhältnis immer  $> 2$ . Besonders hoch war das Chl *a*:POM-Verhältnis im Vergleich mit der Ostsee und dem Zingster Strom. Es war viermal höher als in den anderen beiden Gewässern. Damit besteht das Seston vermutlich zum Großteil aus frischem und autochthon produziertem organischem Material. Ein Anteil von 13 bis 77% des Sestons, im Mittel 40%, bestand aus anorganischem Material. Die POC:PN-, POC:PP- und PN:PP-Verhältnisse lagen nahe an den Redfield-Verhältnissen von 7:1, 106:1 und 16:1 (Tabelle 3.1). Das PP:POM-Verhältnis lag wie in der Ostsee meist über dem Grenzwert von 0,32. Dies deutet auf eine gute N- und P-Versorgung der Planktongemeinschaft hin (Tabelle A1).

Der Zingster Strom zeigte wie die Ostsee ein Chl *a*:Seston-Verhältnis von  $< 2$ . Der Anteil von anorganischem Material am Seston war mit 17 bis 45% wesentlich geringer als in der Ostsee und nur etwas geringer als in der Warnow. Die POC:PN-, POC:PP- und PN:PP-Verhältnisse waren im Zingster Strom sehr viel höher als in der Ostsee und der Warnow (Tabelle 3.1). Die

POC:PP- und PN:PP-Verhältnisse lagen immer weit über dem Redfield-Verhältnis von 106:1 und 16:1. Das POC:PN-Verhältnis war immer größer als das Redfield-Verhältnis von 6,6. All diese Faktoren weisen auf stark abgebautes organisches Material hin, mit geringen Anteilen von N und P im Verhältnis zu C. Das PP:POM-Verhältnis war im Zingster Strom immer  $< 0,1$ . Dies spricht zusätzlich für eine starke P-Limitation des Planktons (Tabelle A1).

In der Warnow und im Zingster Strom korrelierte der Chl *a*-Gehalt signifikant positiv mit dem Seston, POM-, POC-, PN- und PP-Gehalt (Tabelle A3). Im Zingster Strom galt dies auch für die Bakterienabundanz, wenn auch etwas abgeschwächt. Damit war die Produktion des Sestons in der Warnow mit der Algenentwicklung und im Zingster Strom mit der Algen- und Bakterienentwicklung verbunden. In der Ostsee bestand kein Zusammenhang zwischen dem Chl *a*-Gehalt oder der Bakterienabundanz und dem Seston bzw. den POM-Bestandteilen (Tabelle A3).

Die beiden Enzymaktivitäten, AlkPA und PepA, stiegen unnormiert mit dem Eutrophierungsgrad der Gewässer von der Ostsee über die Warnow zum Zingster Strom an (Tabelle 3.1 und A4). Im Zingster Strom lagen die beide Enzymaktivitäten im gleichen Größenverhältnis vor, während in der Ostsee die PepA um den Faktor 11 und in der Warnow die PepA um den Faktor 6 größer war als die AlkPA. Wurden die Enzymaktivitäten über einen Biomasseparameter normiert änderte sich die Abfolge der Gewässer von der kleinsten hin zur größten Aktivität. Die partikuläre AlkPA/PP war in der Warnow und der Ostsee in der gleichen Größenordnung und im Zingster Strom am größten (Tabelle 3.1 und A4). Die PepA/Bakterienabundanz war dagegen im Zingster Strom am kleinsten und in der Ostsee am größten (Tabelle A4).

In der Ostsee bestand eine signifikante Korrelation zwischen der partikulären AlkPA und einem Biomasseparameter nur für den POM-Gehalt (Tabelle A5). Für die partikuläre PepA zeigte sich in der Ostsee zu keinem Biomasseparameter einen Zusammenhang (Tabelle A6). In der Warnow und dem Zingster Strom korrelierte die partikuläre AlkPA signifikant positiv mit dem Seston- und POM-Gehalt sowie mit der partikulären PepA. Nur im Zingster Strom bestand zwischen der partikuläre AlkPA und dem Chl *a*-Gehalt eine signifikant positive Korrelation. Die partikuläre PepA der Warnow und des Zingster Stroms zeigten zu dem Seston-, POM-, POC- und Chl *a*-Gehalt einen signifikant positiven Zusammenhang.

Die  $K_M$ -Werte der AlkPA waren in der Ostsee signifikant höher als in der Warnow und dem Zingster Strom (Tabelle A4). In allen drei Gewässern waren die  $K_M$ -Werte meist sehr viel geringer als die DOP-Konzentrationen und zeigten mit diesen auch keine signifikanten Zusammenhänge (Tabelle 3.1, A7, A8 und A9).

Tabelle 3.1: Die abiotischen und biotischen Parameter der drei untersuchten Gewässer im Vergleich; angegeben als Median; Minimum bis Maximum

	Ostsee	Warnow	Zingster Strom
Temperatur (°C)	12,3; 1,6 – 20	10,4; 0,5 – 22,7	9,8; -0,6 – 22,2
pH	7,9; 7,7 – 8,2	7,9; 7,6 – 8,4	8,6; 8,0 – 9,4
Salinität	11,4; 9,6 – 17,5	0,3; 0,1 – 0,3	7,0; 4,5 – 8,7
Chl <i>a</i> (µg l <sup>-1</sup> )	2,1; 0,5 – 4,7	30,5; 11,1 – 94,3	57,5; 28,5 – 137,3
Bakterienabundanz (10 <sup>6</sup> Zellen ml <sup>-1</sup> )	0,6; 0,1 – 2,3	6,2; 0,7 – 12,9	25,3; 10,2 – 46,8
Chl <i>a</i> :Seston (µg mg <sup>-1</sup> )	0,7; 0,1 – 3,3	4,1; 2,4 – 9,8	1,0; 0,5 – 1,5
Chl <i>a</i> :POM (µg mg <sup>-1</sup> )	1,4; 0,2 – 7,0	6,8; 4,6 – 14,5	1,4; 0,7 – 2,3
POC:PN (mol mol <sup>-1</sup> )	6,4; 5,4 – 7,8	6,6; 5,9 – 8,1	9,5; 7,8 – 12,1
POC:PP (mol mol <sup>-1</sup> )	64; 26 – 681	103; 59 – 176	467; 327 – 1043
PN:PP (mol mol <sup>-1</sup> )	12; 4 – 90	16; 9 – 29	52; 38 – 128
PP:POM (µmol mg <sup>-1</sup> )	0,33; 0,05 – 1,42	0,36; 0,08 – 0,96	0,06; 0,03 – 0,10
TP (µM)	1,1; 0,7 – 2,3	2,8; 2,2 – 4,3	3,2; 2,2 – 5,6
DOP (µM)	0,5; 0,0 – 0,8	0,9; 0,3 – 1,4	0,6; 0,3 – 2,0
DIP (µM)	0,3; 0,0 – 1,7	0,3; 0,0 – 1,2	0,04; 0,0 – 0,5
DIN (µM)	3,5; 0,9 – 133,3	29,1; 3,4 – 196,8	6,4; 0,9 – 103,7
Gesamt-AlkPA (nmol l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	38; 16 – 69	181; 78 – 1045	2643; 1070 – 9194
Gelöste AlkPA (% von Gesamt-AlkPA)	39; 25 – 91	27; 11 – 60	6; 2 – 34
Partik. AlkPA/PP (nmol µg <sup>-1</sup> PP h <sup>-1</sup> )	2,04; 0,13 – 6,19	2,45; 1,34 – 11,73	39,5; 10,7 – 151,1
K <sub>M</sub> der Gesamt-AlkPA (µM)	16,2; 3,5 – 60,0	5,8; 1,0 – 28,3	5,3; 1,8 – 14,6
K <sub>M</sub> der gelösten AlkPA (µM)	8,7; 0,6 – 38,9	7,4; 0,5 – 19,1	0,9; 0,3 – 2,8
K <sub>M</sub> der partik. AlkPA (µM)	18,3; 0,2 – 92,3	4,8; 1,1 – 33,8	6,6; 2,3 – 15,6
Gesamt-PepA (nmol l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	436; 153 – 1509	1130; 366 – 2876	3046; 1975 – 4862
Gelöste PepA (% von Gesamt-PepA)	8; 2 – 33	8; 1 – 21	3; 0,5 – 11
Partik. PepA/Bakterienabundanz (fmol Zellen <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,72; 0,21 – 2,96	0,19; 0,03 – 1,23	0,12; 0,06 – 0,21

AlkPA = alkaline Phosphataseaktivität, Chl *a* = Chlorophyll *a*, DIN = gelöster anorganischer Stickstoff, DIP = gelöster anorganischer Phosphor, DOP = gelöster organischer Phosphor, K<sub>M</sub> = Michaeliskonstante, Partik. = Partikulär; PepA = Aminopeptidaseaktivität, PN = partikulärer Stickstoff, POC = partikulärer organischer Kohlenstoff, POM = partikuläres organisches Material; PP= partikulärer Phosphor, TP = Gesamtphosphor

### 3.1.2 Die größenfraktionierte alkaline Phosphatase- und Aminopeptidaseaktivität

Die größenfraktionierten AlkPA-Messungen zeigten deutliche Unterschiede in der Herkunft der AlkPA zwischen den drei untersuchten Gewässern. Der größte Unterschied lag in dem hohen Anteil der gelösten AlkPA an der Gesamt-AlkPA in der Warnow und in der Ostsee im Vergleich zum Zingster Strom (Tabelle 3.1 und Abb. 3.1). In der Ostsee war der Anteil der gelösten AlkPA variabel und machte teilweise einen beträchtlichen Anteil von bis zu 91% an der Gesamt-AlkPA aus. Dagegen war im Zingster Strom der Anteil der gelösten AlkPA an der Gesamt-AlkPA meist unter 16% (90% Perzentile).

Der Hauptanteil der partikulären AlkPA stammte in allen drei Gewässern von der Größenfraktion  $0,2 - 1 \mu\text{m}$  (Abb. 3.1) und damit von Bakterien und Picocyanobakterien. In der Warnow und im Frühling in der Ostsee war die drittwichtigste AlkP<sub>asen</sub>-produzierende Gruppe die  $1 - 20 \mu\text{m}$  Größenfraktion (Abb. 3.1). Diese Fraktion kann Cyanobakterienkolonien, Chlorophyceen und zentrische Diatomeen beinhalten. In der Warnow und im Winter in der Ostsee entfielen weitere 10 bis 20% auf die  $20 - 50 \mu\text{m}$  und  $> 50 \mu\text{m}$  Fraktionen, welche unterschiedlich lange Diatomeenketten umfassen können.

Im Zingster Strom war die zweitwichtigste AlkP<sub>asen</sub>-produzierende Gruppe die  $1 - 5 \mu\text{m}$  Größenfraktion, vor allem im Frühjahr (Abb. 3.1). In diese Fraktion gehören solitäre Pico- und Nanocyanobakterien und sehr kleine Cyanobakterienkolonien. Die Größenfraktionen  $5 - 10 \mu\text{m}$ ,  $10 - 20 \mu\text{m}$  und  $> 20 \mu\text{m}$  produzierten zusammen im Zingster Strom zu allen Probenahmezeitpunkten niemals mehr als 15% der partikulären AlkPA. Diese Fraktionen können kleine und große Cyanobakterienkolonien, die zusätzlich von Gallerthüllen umgeben sein können, Cyanobakterien-Trichome, Chlorophyceen sowie im Frühjahr Diatomeen beinhalten (Schumann und Karsten 2006; Schumann et al. 2009).

Die partikuläre PepA hatte in allen drei Gewässern ihren Ursprung hauptsächlich in der  $0,2 - 1 \mu\text{m}$  Größenfraktion und wurde damit, wie die partikuläre AlkPA, zum Großteil von Bakterien und Cyanobakterien produziert (Abb. 3.2). Auf die Größenfraktionen  $> 1 \mu\text{m}$  entfielen in der Ostsee und im Zingster Strom sehr kleine Anteile von 4 – 13%. Nur in der Warnow stammten weitere 30% der partikulären PepA von der  $1 - 20 \mu\text{m}$  Fraktion. Der Anteil der gelösten PepA an der Gesamt-PepA war in allen drei Gewässern recht gering (Tabelle 3.1 und Abb. 3.2).



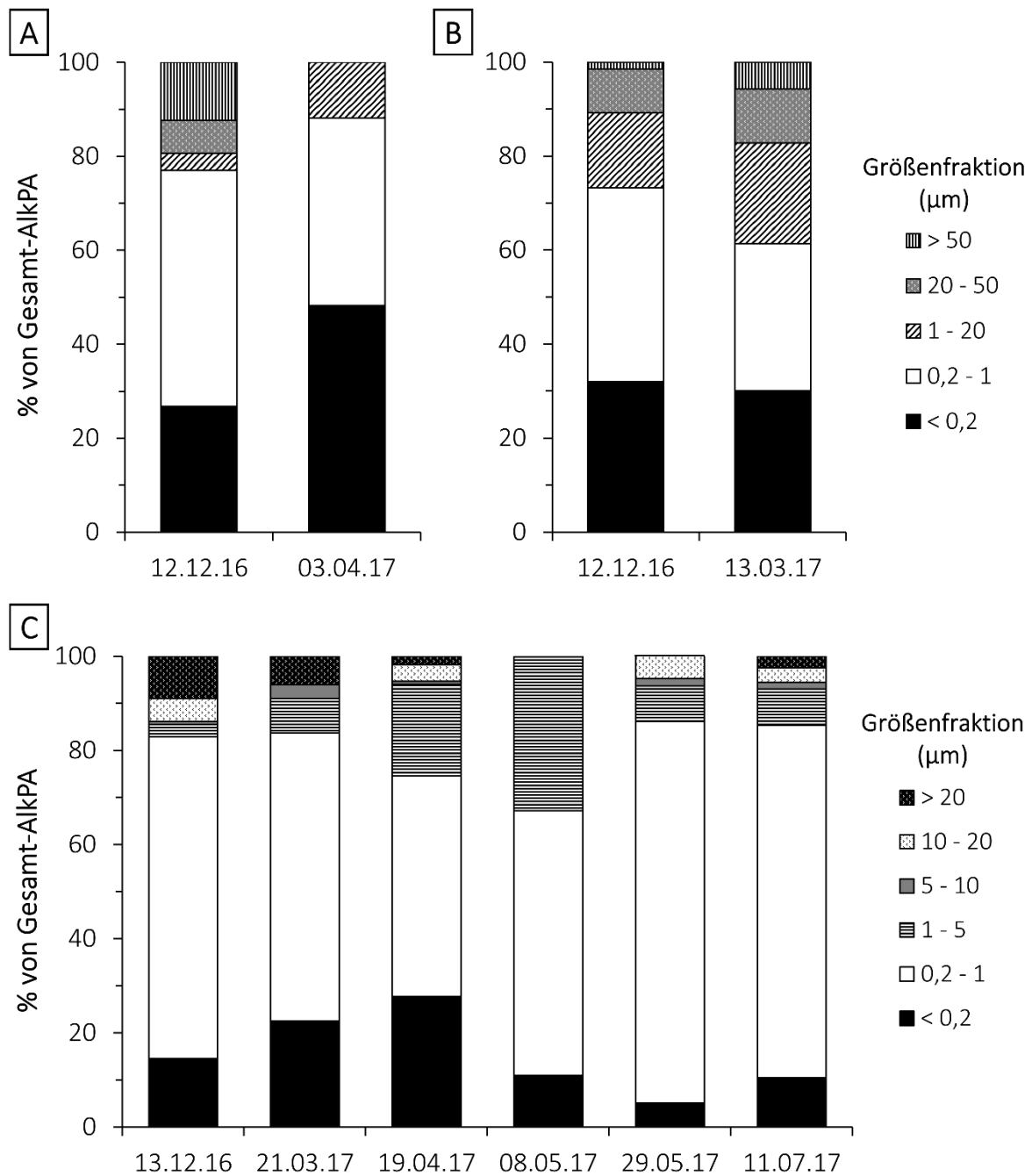


Abb. 3.1: Der prozentuelle Anteil von verschiedenen Größenklassen an der gesamten alkalinen Phosphataseaktivität (Gesamt-AlkPA) in der a) Ostsee, b) Warnow und c) Zingster Strom zu verschiedenen Zeitpunkten; Zingster Strom-Proben wurden in kleinere Größenklassen getrennt als die Ostsee- und Warnow-Proben – siehe Legende

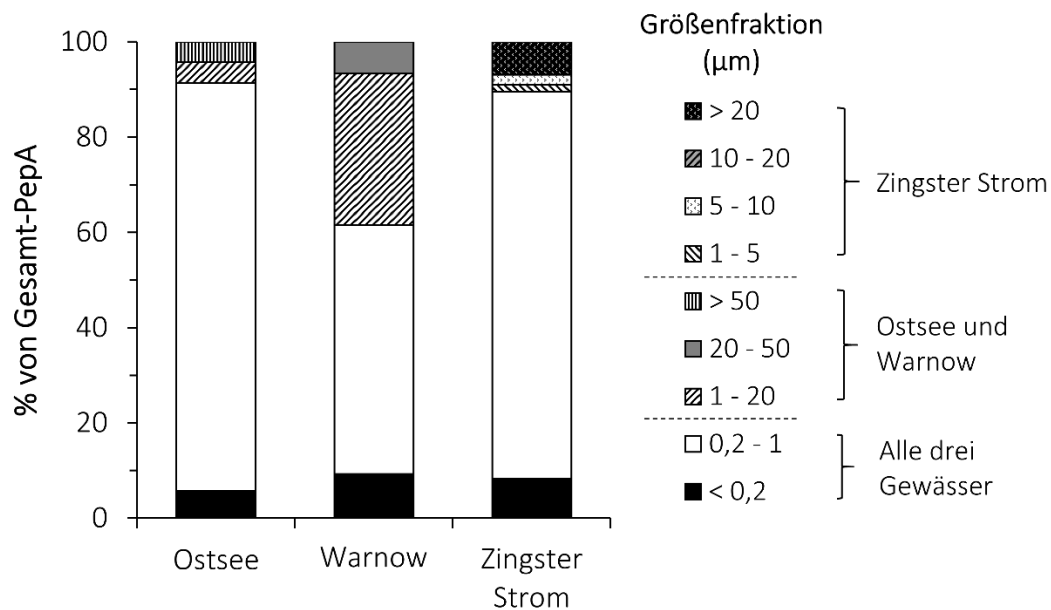


Abb. 3.2: Der prozentuelle Anteil von verschiedenen Größenklassen an der gesamten Aminopeptidaseaktivität (Gesamt-PepA) der Ostsee, Warnow und Zingster Strom im Frühjahr 2017; Zingster Strom-Proben wurden in kleinere Größenklassen getrennt als die Ostsee- und Warnow-Proben – siehe Legende

### 3.1.3 Die Michaeliskonstanten der einzelnen Größenfraktionen

Bei der Berechnung der  $K_M$ -Werte für die Größenfraktionen ergaben sich Probleme. Die Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  wurde zuerst in den Vollproben gemessen. Anschließend wurden die Vollproben durch die verschiedenen Filter filtriert, angefangen vom größten bis zum kleinsten Filter. Damit beinhaltete z. B. das Filtrat 50  $\mu\text{m}$  alle Organismen die kleiner als 50  $\mu\text{m}$  waren. Die in den Filtraten gemessenen  $V$ -Werte ergaben gute Michaelis-Menten-Kurven aus denen verlässlich  $V_{\text{max}}$  und  $K_M$  berechnet werden konnten (Abb. 3.5 a und b). Dabei zeigte sich, dass der  $K_M$  vom partikelfreien Filtrat (0,2  $\mu\text{m}$ ) zur Vollprobe immer anstieg (Abb. 3.3 und 3.4). Der Anstieg der  $K_M$ -Werte vom kleinsten Filtrat bis zur Vollprobe war zwischen den drei Gewässern und den Probenahmezeitpunkten unterschiedlich (Abb. 3.4).

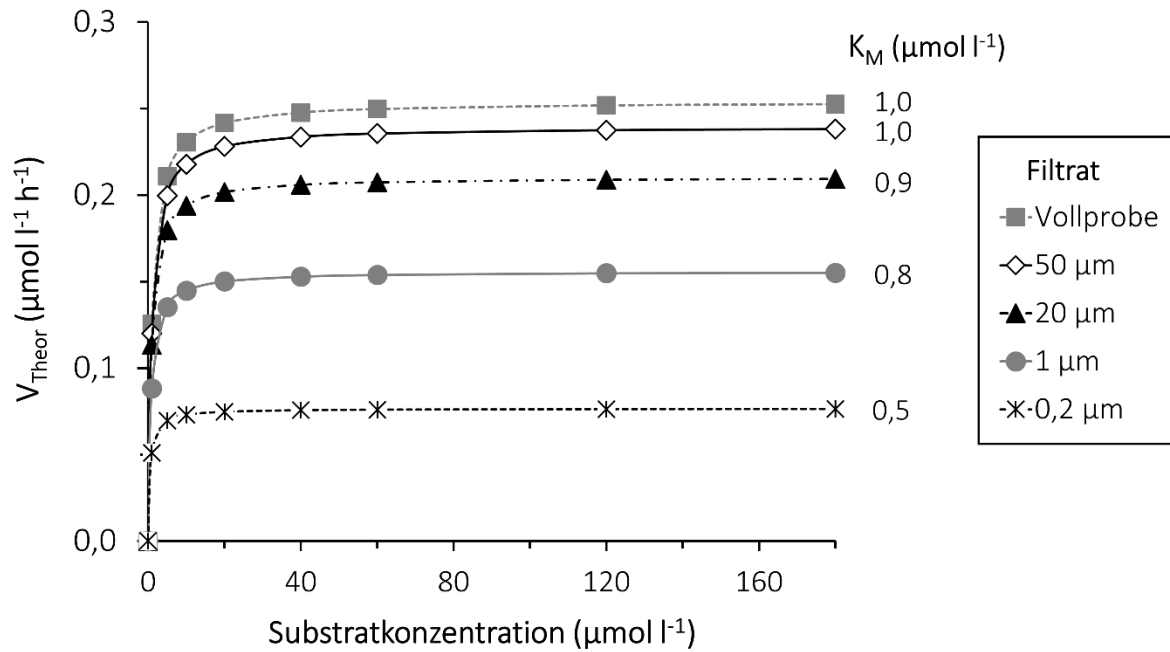


Abb. 3.3: Die theoretischen Reaktionsgeschwindigkeiten ( $V_{\text{Theor}}$ ;  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Symbole) mit den Michaeliskonstanten ( $K_M$ ;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ; am Ende der Kurven angegeben) der alkalinen Phosphataseaktivität für die einzelnen Filtrate und der Vollprobe am Beispiel einer Warnowprobe vom 13.03.2017

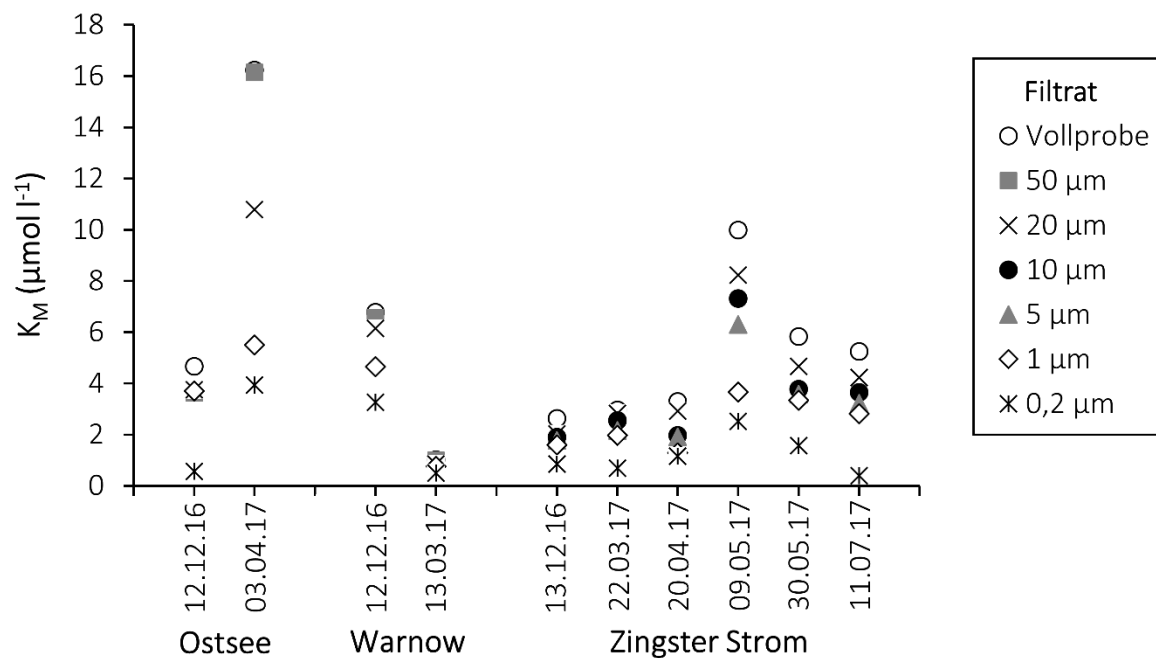


Abb. 3.4: Die Michaeliskonstanten ( $K_M$ ;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) der Filtrate und der Vollprobe aller größenfraktionierten alkalischen Phosphataseaktivitäts-Messungen der Ostsee, Warnow und des Zingster Stroms

Um aus den gemessenen V-Werten der Filtrate und der Vollprobe  $V_{\max}$  und  $K_M$  für die einzelnen Größenfraktionen ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ,  $0,2 - 1 \mu\text{m}$ ,  $1 - 20 \mu\text{m}$ ,  $20 - 50 \mu\text{m}$  und  $> 50 \mu\text{m}$  für die Ostsee und Warnow bzw.  $< 0,2 \mu\text{m}$ ,  $0,2 - 1 \mu\text{m}$ ,  $1 - 5 \mu\text{m}$ ,  $5 - 20 \mu\text{m}$ ,  $> 20 \mu\text{m}$  für den Zingster Strom) zu berechnen, wurden die V-Werte der entsprechenden Filtrate voneinander subtrahiert. Für die  $> 50 \mu\text{m}$  Größenfraktion wurden z. B. die V-Werte des Filtrats  $50 \mu\text{m}$  von den V-Werten der Vollprobe abgezogen. Die berechneten V-Werte der Größenfraktionen ergaben nicht immer saubere Michaelis-Menten-Kurven (Abb. 3.5 c). Daher konnten  $V_{\max}$  und  $K_M$  nicht immer zuverlässig berechnet werden (Tabelle 3.2).

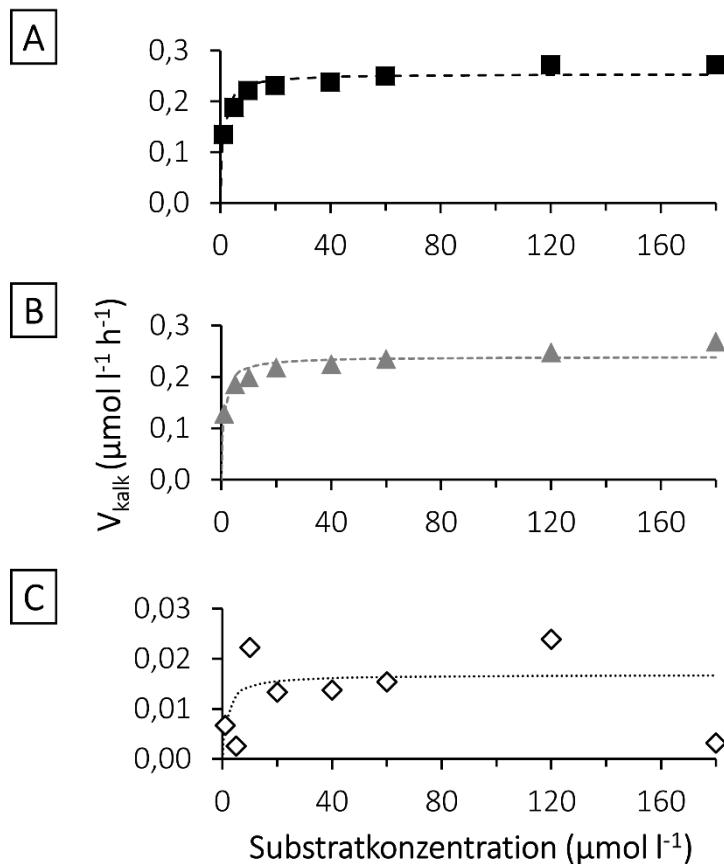


Abb. 3.5: Die kalkultierten Reaktionsgeschwindigkeiten ( $V_{\text{kalk}}$ ;  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Symbole) mit den theoretischen Michaelis-Menten-Kurven (Linien) der alkalinen Phosphataseaktivität in a) der Vollprobe, b) dem  $50 \mu\text{m}$  Filtrat und c) der  $> 50 \mu\text{m}$  Größenfraktion ( $V_{\text{kalk}}$  der Vollprobe minus  $V_{\text{kalk}}$  des  $50 \mu\text{m}$  Filtrats) am Beispiel einer Warnowprobe vom 13.03.2017

Zumindest für die kleinen Größenklassen konnten die  $K_M$ -Werte ermittelt werden. Es zeigte sich, dass der  $K_M$  von der  $< 0,2 \mu\text{m}$  bis zur  $1 - 5 \mu\text{m}$  Größenfraktion anstieg, in der Vollprobe aber wieder kleiner war als in der  $1 - 5 \mu\text{m}$  Größenfraktion (Tabelle 3.2). Die Summe der  $V_{\max}$

der einzelnen Größenfraktionen ergab immer den  $V_{\max}$  der Vollprobe. Dagegen bestand der  $K_M$ -Wert der Vollprobe niemals aus der Summe aller  $K_M$ -Werte der einzelnen Größenfraktionen. Vielmehr scheint es so, als ob der  $K_M$ -Wert der Vollproben ein mittlerer Wert aus den  $K_M$ -Werten der einzelnen Größenfraktionen darstellt (Tabelle 3.2).

Neben den Größenfraktionierten AlkPA-Messungen wurden, in den Analysen über einen ganzen Jahresgang hinweg, die  $K_M$ -Werte in den Vollproben und in den partikelfreien Filtraten ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ) bestimmt. Durch die Subtraktion der AlkPA der Filtrate von den Vollproben wurden die  $K_M$ -Werte der Partikel berechnet. Die  $K_M$ -Werte der gelösten Fraktion waren meist kleiner bzw. die  $K_M$ -Werte der partikulären Fraktion waren meist größer als die  $K_M$ -Werte der Vollprobe, jedoch nicht immer (Tabelle 3.1). Auch hier scheint es so, als ob die  $K_M$ -Werte der Vollproben ein mittlerer Wert aus den  $K_M$ -Werten der gelösten und partikulären Fraktionen darstellt. Dass die  $K_M$ -Werte der Vollprobe nicht dem genauen Mittelwert der  $K_M$ -Werte der gelösten und partikulären Fraktionen entsprechen, liegt vermutlich an einer unterschiedlichen Gewichtung, die aus der unterschiedlichen Anzahl der gelösten und partikulären AlkP<sub>asen</sub> resultiert. Im Zingster Strom war der Anteil der gelösten AlkPA an der Gesamt-AlkPA gering (Tabelle 3.1). Die  $K_M$ -Werte der gelösten Fraktion sollten daher nur geringfügig zum  $K_M$  der Vollprobe beitragen. Und tatsächlich sind die  $K_M$ -Werte der partikulären Fraktion im Zingster Strom sehr nahe an den  $K_M$ -Werten der Vollprobe dran (Abb. 3.6).

Tabelle 3.2: Die Michaeliskonstanten ( $K_M$ ;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) der alkalinen Phosphataseaktivität der verschiedenen Größenfraktionen und der Vollprobe (VP) der Ostsee, Warnow und Zingster Strom zu verschiedenen Messzeitpunkten; nk = nicht kalkulierbar

		$K_M$					
Größenfraktion		$< 0,2\mu\text{m}$	$0,2 - 1\mu\text{m}$	$1 - 20\mu\text{m}$	$20 - 50\mu\text{m}$	$> 50\mu\text{m}$	VP
Ostsee	12.12.16	0,6	nk	nk	nk	nk	4,7
	03.04.17	3,9	13,1	nk	nk	nk	16,2
Warnow	12.12.16	3,3	3,4	nk	nk	nk	6,8
	13.03.17	0,5	0,6	nk	nk	nk	1,0
Größenfraktion		$< 0,2\mu\text{m}$	$0,2 - 1\mu\text{m}$	$1 - 5\mu\text{m}$	$5 - 20\mu\text{m}$	$> 20\mu\text{m}$	VP
Zingster Strom	13.12.16	0,9	1,8	nk	nk	nk	2,6
	22.03.17	0,7	3,0	6,4	nk	nk	3,0
	20.04.17	1,2	1,4	7,0	nk	nk	3,3
	09.05.17	2,5	3,8	23,4	nk	nk	10,0
	30.05.17	1,6	3,5	6,1	nk	nk	5,8
	11.07.17	0,4	3,7	15,2	nk	nk	5,3

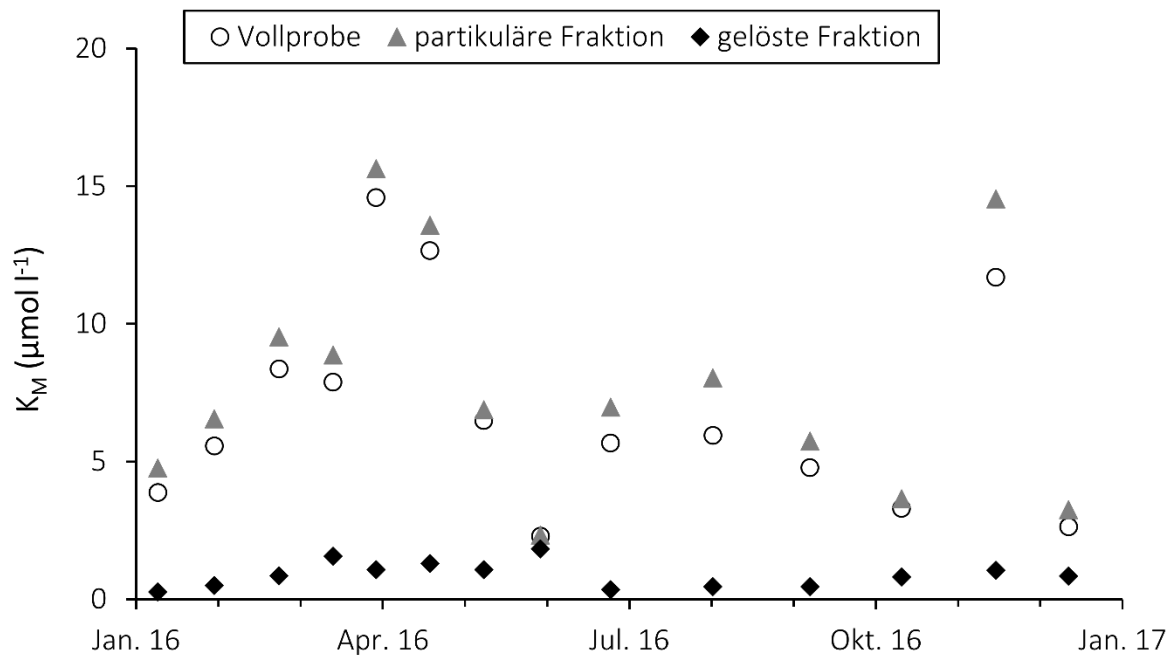


Abb. 3.6: Die Michaeliskonstanten ( $K_M$ ;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) der alkalinen Phosphataseaktivität der Vollprobe und der gelösten bzw. partikulären Fraktion im Verlauf des Jahres 2016 am Beispiel des Zingster Stroms

### 3.1.4 Die drei untersuchten Gewässer im Jahresgang

In der Ostsee nahmen im zeitigen Frühjahr, mit dem Anstieg des Chl *a*-Gehalts, die Nährstoffgehalte von DIN und DIP ab (Abb. 3.7 a und b). Zum Maximum der Frühjahrsblüte stieg die partikuläre AlkPA/PP auf  $4,3 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$  an und zeigte damit eine mittlere P-Limitation an (Tabelle A1), obwohl der DIP-Gehalt noch bei über  $0,5 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  lag (Abb. 3.7 b und c). Im Gegensatz zum DIN-Gehalt wurde der DIP-Gehalt im Zuge der Frühjahrsblüte komplett aufgebraucht. Zeitgleich sank die partikuläre AlkPA/PP unter die Grenze für eine P-Limitation. Über die Sommermonate hinweg lag der DIP-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze, während der DIN-Gehalt zu keinem Probenahmezeitpunkt völlig aufgebraucht wurde. Dadurch stieg das DIN:DIP-Verhältnis von circa 20 im Frühjahr auf circa 60 im Sommer an. Die partikuläre AlkPA/PP nahm kontinuierlich über den Sommer zu und zeigte ihr höchstes Niveau im September bei  $5,1 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$  (mittlere P-Limitation). Im Oktober stiegen die Nährstoffgehalte DIP und DIN wieder an, wodurch das DIN:DIP-Verhältnis auf 10 abnahm. Daraufhin sank auch die partikuläre AlkPA/PP auf unter  $2 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$  in den Bereich des Grundrauschens ab (Tabelle A1). Im Herbst wurden die DIP- und DIN-Gehalte von einer ausgeprägten Herbstblüte erneut reduziert. Dabei wurde der DIP-Gehalt, im Gegensatz zum DIN-Gehalt, abermals aufgebraucht. Damit stieg das DIN:DIP-Verhältnis auf 554, welches eine

starke P-Limitation anzeigt. Durch die P-Limitation im Herbst stieg die partikuläre AlkPA/PP erneut auf  $3,6 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$  an (mittlere P-Limitation). Im Winter erhöhte sich der DIP-Gehalt, wodurch das DIN:DIP-Verhältnis auf 5 in die N-Limitation absank (Abb. 3.7 b). Die partikuläre AlkPA/PP nahm daraufhin wieder ab (Abb. 3.7 c). Der  $K_M$  der partikulären AlkPA reichte in der Ostsee von  $0,2$  bis  $92,3 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . Die niedrigsten  $K_M$ -Werte und damit die höchsten Affinitäten der partikulären AlkPA zum artifiziellen Substrat wurden im August und im Januar gemessen (Daten nicht gezeigt). Die Bakterienabundanz in der Ostsee zeigte zwei markante Maxima, und zwar zum Ende der Frühjahrsblüte und zum Ende der Sommerblüte (Abb. 3.7 a). Die partikuläre PepA/Bakterien-abundanz stieg im April an, sank jedoch recht schnell wieder ab und blieb für den Rest des Jahres auf einem niedrigen Niveau (Abb. 3.7 c). Obwohl die größenfraktionierten Enzymmessungen zeigten, dass zumindest im Frühling hauptsächlich Bakterien die Produzenten der partikulären AlkPA und PepA waren (Abb. 3.1), bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der partikulären AlkPA bzw. PepA und der Bakterienabundanz (Tabelle A5 und A6). Auch für die partikuläre PepA, die als Parameter für die Bakterienaktivität genutzt werden kann, bestand keine Korrelation zu der partikulären AlkPA (Tabelle A5).

In der Warnow startete die Frühjahrsblüte später als an der Ostseeküste und sie erreichte ihr Maximum Anfang Mai (Abb. 3.8 a). Der DIP-Gehalt sank bereits Mitte Februar unter die Nachweisgrenze, während der DIN-Gehalt erst zum Maximum der Frühjahrsblüte zur Neige ging (Abb. 3.8 b). Der DIN-Gehalt sank jedoch niemals, wie in den anderen zwei Gewässern, auf unter  $3 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . Durch das Überangebot an DIN resultierten sehr hohe DIN:DIP-Verhältnisse von 4000 im März bis 140 Anfang Mai, die auf eine starke P-Limitation schließen lassen. Die partikuläre AlkPA/PP stieg mit der Abnahme des DIP-Gehalts auf  $9,2 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$  (mittlere P-Limitation), sank dann wieder leicht ab, und stieg erneut auf ein Jahresmaximum von  $11,7 \text{ } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$  (starke P-Limitation) zum Höhepunkt der Frühjahrsblüte an (Abb. 3.8 c). Im Sommer nahmen der DIP- und DIN-Gehalt in der Warnow wieder leicht zu, woraufhin die partikuläre AlkPA/PP abnahm. Die steigenden Nährstoffgehalte im Sommer nährten eine schwache Sommerblüte und eine stark ausgeprägte Herbstblüte. Durch die Herbstblüte wurden die DIN- und DIP-Gehalte erneut aufgebraucht, was in einem DIN:DIP-Verhältnis von 28 resultierte. Auf die Abnahme des DIP-Gehalts im Herbst zeigte die partikuläre AlkPA/PP keine Reaktion und sank sogar weiter in den Bereich des Grundrauschens. Allerdings fiel der DIP-Gehalt nicht wie im Frühjahr auf unter  $0,2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . Der  $K_M$  der partikulären AlkPA reichte in der Warnow von  $1,1$  bis  $33,8 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . Die höchsten  $K_M$ -Werte und damit die geringsten Affinitäten der AlkP<sub>asen</sub> zum artifiziellen Substrat wurden zwischen Juni und September

gemessen. Die Bakterienabundanz in der Warnow hatte einen ähnlichen Verlauf wie der Chl *a*-Gehalt, mit einem Höhepunkt zur Frühlings-, Sommer- und Herbstblüte (Abb. 3.8 a). Daher korreliert die Bakterienabundanz signifikant positiv mit dem Chl *a*-Gehalt (Tabelle A3). Die partikuläre PepA/Bakterienabundanz zeigte ihr Maximum im Februar und die niedrigsten Werte in den Sommermonaten (Abb. 3.8 c).

Im Zingster Strom ließ sich, mit dem Aufbrechen der Eisbedeckung Ende Januar, eine recht kurzlebige Blüte beobachten, die vermutlich von Cryptophyceen gebildet wurde (Abb. 3.9 a; Schumann und Karsten 2006). Im Gegensatz zu den anderen beiden Gewässern war der DIP-Gehalt auch in den Wintermonaten sehr niedrig (Abb. 3.9 b). Zusammen mit den hohen DIN-Gehalten resultierten sehr hohe DIN:DIP-Verhältnisse zwischen 140 und 1700 im Winter und zeitigen Frühjahr. Die Frühlingsblüte startete im März und zeigte ihr Maximum im April. Der bereits geringe DIP-Gehalt wurde zum Anfang der Frühlingsblüte vollständig aufgebraucht. Der DIN-Gehalt ging dagegen erst zum Ende der Frühlingsblüte zu Neige. Die partikuläre AlkPA/PP des Zingster Stroms lag selbst im Winter über  $15 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$  und damit das ganze Jahr im Bereich der schweren P-Limitation (Tabelle A1). Während der Cryptophyceen-Blüte und der Frühlingsblüte zeigte die partikuläre AlkPA/PP jeweils zwei kurzfristige Anstiege (Abb. 3.9 c). Die hohen DIN:DIP-Verhältnisse im Frühjahr sanken, mit einer Abnahme des DIN-Gehalts zum Ende der Frühlingsblüte, langsam ab und mündeten Ende Mai bei 13. Die Sommerblüte war recht schwach ausgeprägt. Die DIP- und DIN-Gehalte blieben im Sommer und Herbst durchgängig gering und stiegen erst im Winter wieder an. Das DIN:DIP-Verhältnis lag über den Sommer meist unter 20 und zeigt damit eine leichte N-Limitation an. Über den Sommermonaten nahm die partikuläre AlkPA/PP weiter zu und erreichte ihr Jahresmaximum bei  $151 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$  im September. Während der Herbstblüte im November, mit weiterhin niedrigen Nährstoffkonzentrationen im Umgebungswasser, sank die partikuläre AlkPA/PP wieder ab. Der  $K_M$  der partikulären AlkPA war im Vergleich zur Ostsee und der Warnow, im Zingster Strom am niedrigsten. Er reichte von 2,3 bis  $15,6 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ . Die höchsten  $K_M$ -Werte wurden im April zum Maximum der Frühlingsblüte und im November zum Maximum der Herbstblüte gemessen. Die Bakterienabundanz im Zingster Strom zeigte zwei Jahresmaxima, einen zur Frühlingsblüte und einen zum Anfang des Sommers (Abb. 3.9 a). Die partikuläre PepA/Bakterienabundanz stieg mehrmals über das Jahr hinweg an, und zwar zur Cryptophyceen-Blüte Ende Januar, zum Anstieg der Frühlingsblüte, zum Ende der Frühlingsblüte und zum Ende der Herbstblüte (Abb. 3.9 c).



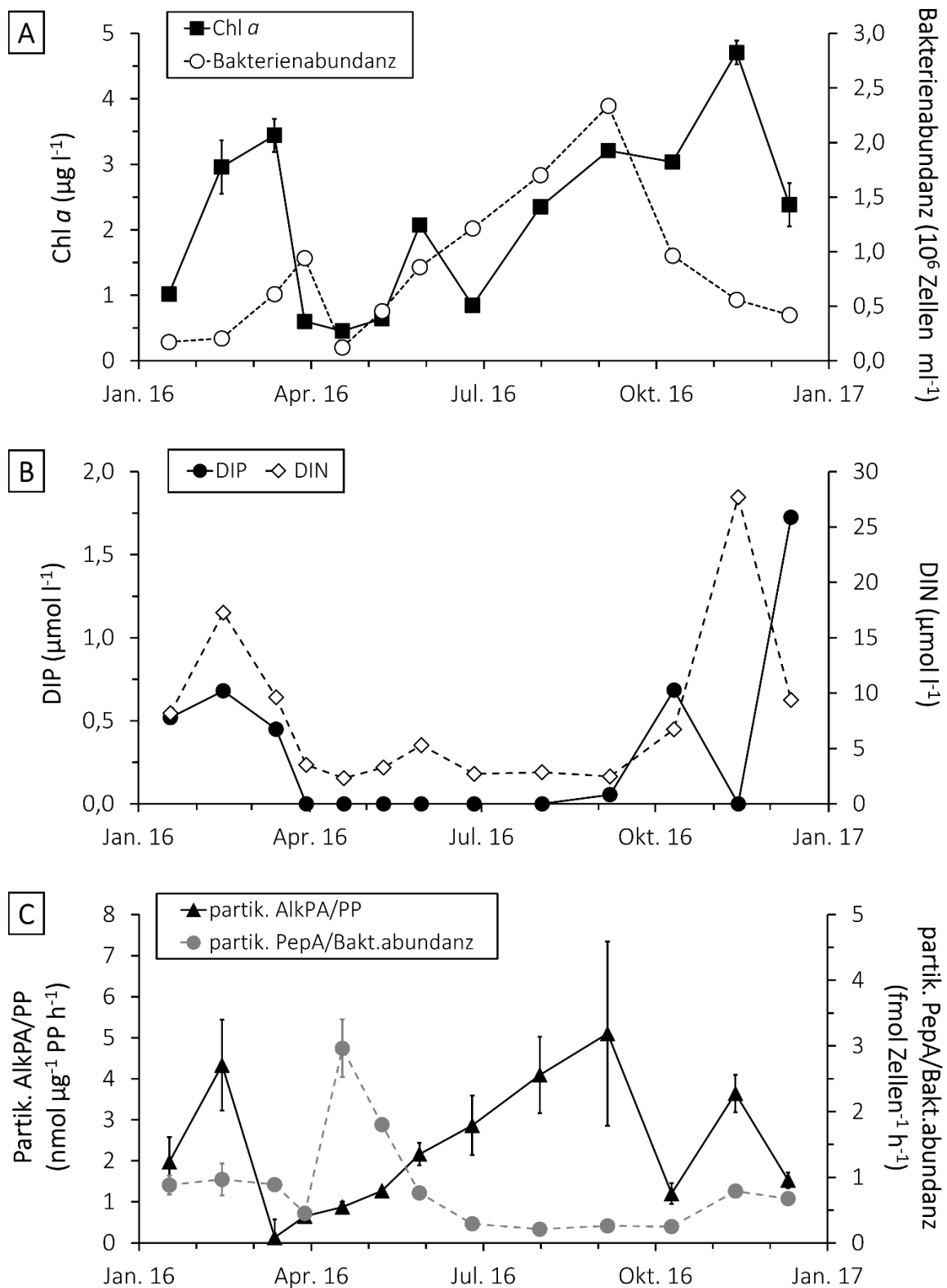


Abb. 3.7: Die abiotischen und biotischen Parameter der Ostsee im Verlauf des Jahres 2016; a) Chlorophyll *a*-Gehalt (Chl *a*;  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) und Bakterienabundanz ( $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ); b) gelöster anorganischer Phosphorgehalt (DIP;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) und Stickstoffgehalt (DIN;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ); c) partikuläre alkaline Phosphataseaktivität normiert über den partikulären Phosphorgehalt (Partik. AlkPA/PP;  $\text{nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$ ) und partikuläre Aminopeptidaseaktivität normiert über die Bakterienabundanz (Partik. PepA/Bakt.abundanz;  $\text{fmol Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

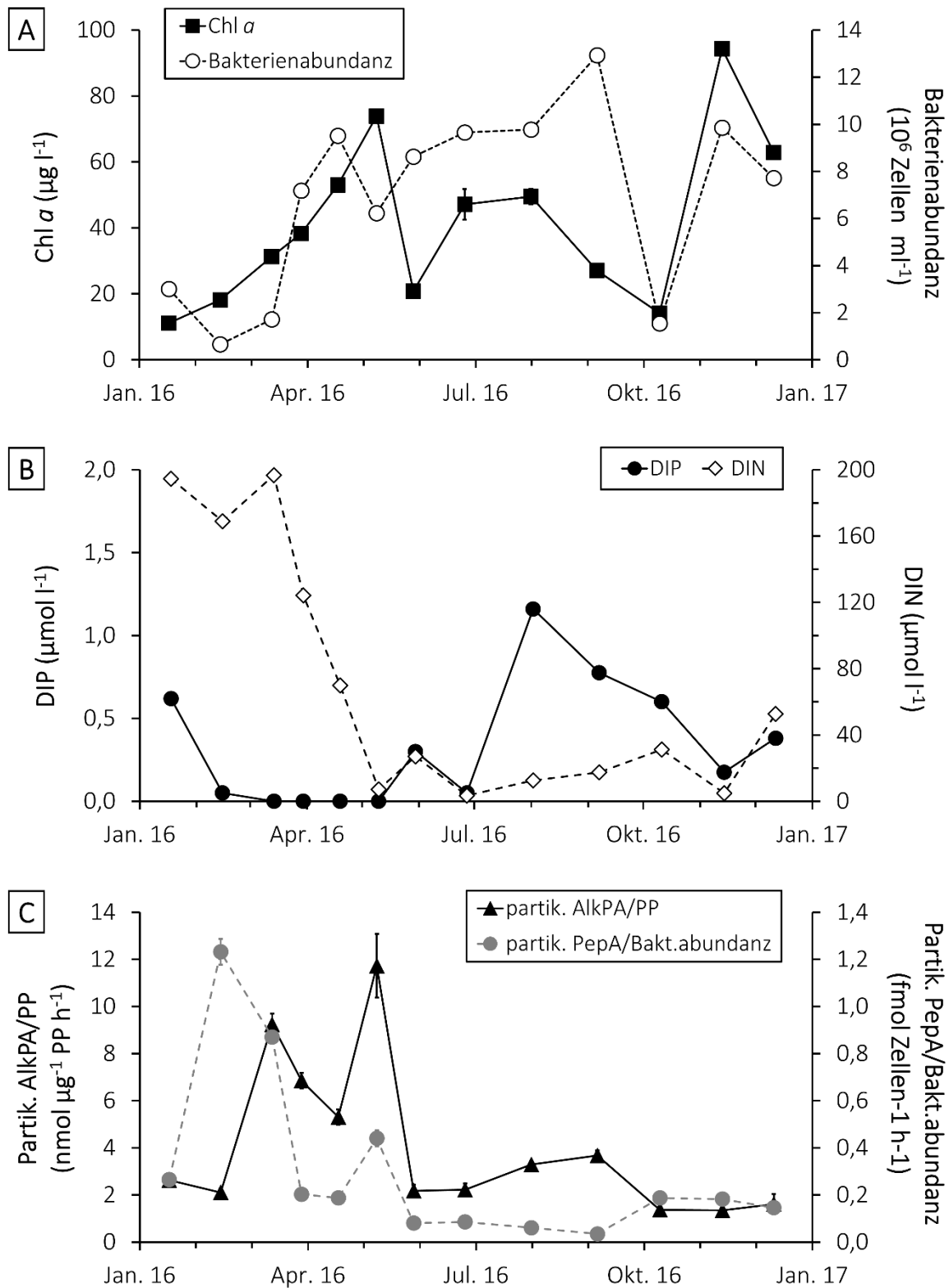


Abb. 3.8: Die abiotischen und biotischen Parameter der Warnow im Verlauf des Jahres 2016; a) Chlorophyll *a*-Gehalt (Chl *a*;  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) und Bakterienabundanz ( $10^6 \text{ Zellen ml}^{-1}$ ); b) gelöster anorganischer Phosphorgehalt (DIP;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) und Stickstoffgehalt (DIN;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ); c) partikuläre alkaline Phosphataseaktivität normiert über den partikulären Phosphorgehalt (Partik. AlkPA/PP;  $\text{nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$ ) und partikuläre Aminopeptidaseaktivität normiert über die Bakterienabundanz (Partik. PepA/Bakt.abundanz;  $\text{fmol Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

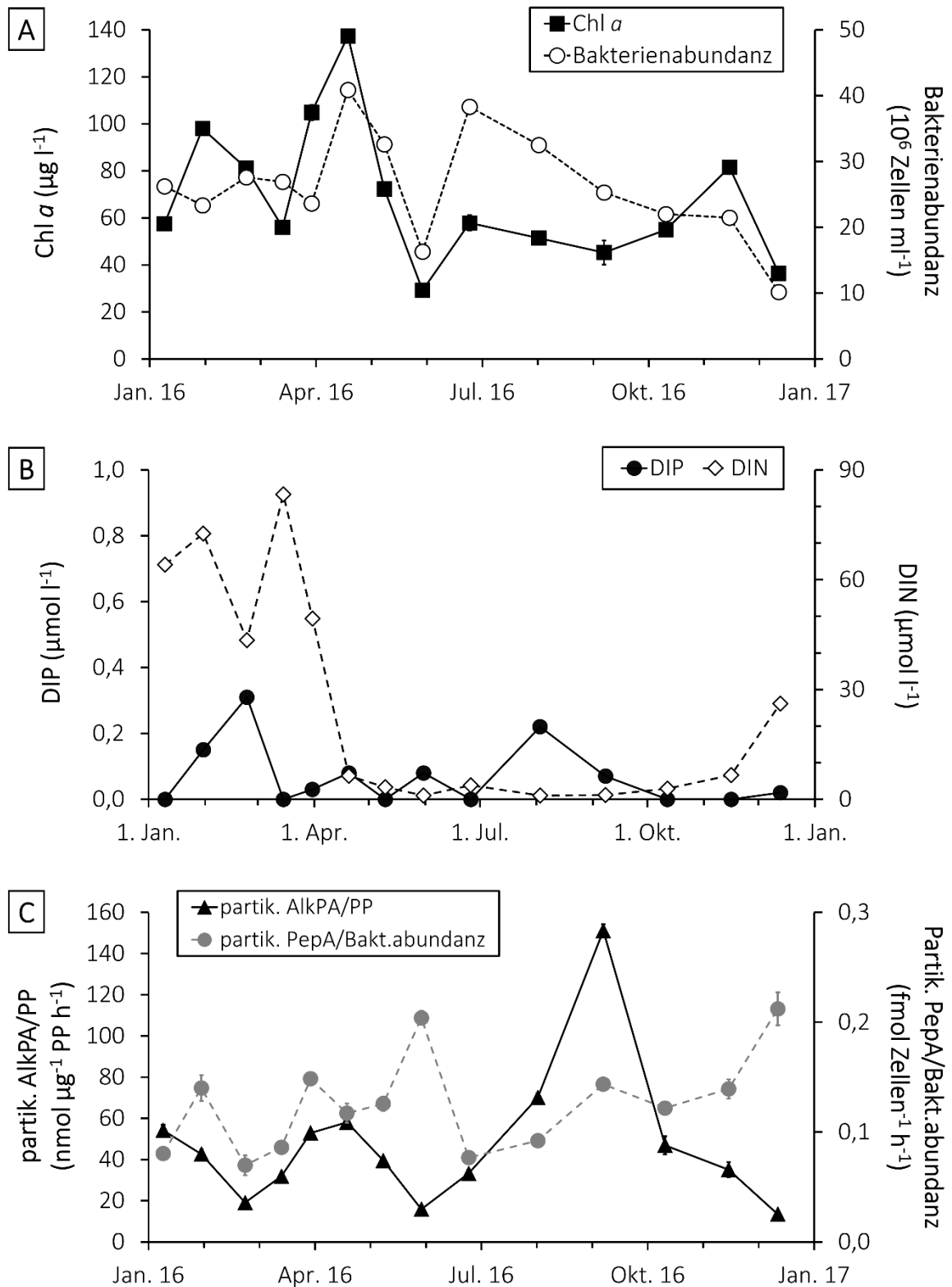


Abb. 3.9: Die abiotischen und biotischen Parameter des Zingster Stroms im Verlauf des Jahres 2016; a) Chlorophyll *a*-Gehalt (Chl *a*;  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) und Bakterienabundanz ( $10^6 \text{ Zellen ml}^{-1}$ ); b) gelöster anorganischer Phosphorgehalt (DIP;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) und Stickstoffgehalt (DIN;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ); c) partikuläre alkaline Phosphataseaktivität normiert über den partikulären Phosphorgehalt (Partik. AlkPA/PP;  $\text{nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$ ) und partikuläre Aminopeptidaseaktivität normiert über die Bakterienabundanz (Partik. PepA/Bakt.abundanz;  $\text{fmol Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

## 3.2 Die Interpretation der alkalinen Phosphataseaktivität

### 3.2.1 Der Einfluss des Normierungsparameters

Um den Einfluss des Normierungsparameters auf die Interpretation der partikulären AlkPA als P-Limitationsindikator zu bewerten, wurde diese über den POM- und Chl *a*-Gehalt sowie über die partikuläre PepA normiert (Abb. 3.10). Vergleicht man die verschiedenen normierten partikulären AlkPA miteinander, fällt zunächst ein Unterschied in der Abfolge von der höchsten zur niedrigsten Aktivität zwischen den drei Gewässern auf. Normiert über den POM-Gehalt und der partikulären PepA war die partikuläre AlkPA in der Warnow höher als in der Ostsee (Abb. 3.10 a und c). Andererseits war die partikuläre AlkPA in der Warnow niedriger als in der Ostsee, wenn diese über den Chl *a*-Gehalt normiert wurde (Abb. 3.10 b). Diese Rangänderung liegt vermutlich an dem sehr viel höheren Chl *a*:POM-Verhältnis in der Warnow im Vergleich zur Ostsee und dem Zingster Strom (Tabelle 3.1). Demnach besaß die Warnow etwa fünfmal mehr Chl *a* pro POM als die anderen beiden Gewässer. Eine Normierung durch den Chl *a*-Gehalt senkt somit die partikuläre AlkPA in der Warnow im Vergleich zu den anderen beiden Gewässern. Die partikuläre AlkPA der Warnow und vor allem der Ostsee waren sehr viel niedriger als die partikuläre AlkPA des Zingster Stroms, wenn diese über die partikuläre PepA normiert wurden, im Vergleich zur Normierung über den POM- oder Chl *a*-Gehalt (Abb. 3.10 c versus a und b). Dies liegt an dem stärkeren Anstieg der partikulären AlkPA als jenem der partikulären PepA zwischen den drei Gewässern (Tabelle 3.1).

Die Wahl des Normierungsparameters zeigte auch Auswirkungen auf die Verteilung der Maxima über das Jahr hinweg (Abb. 3.10). In der Ostsee wurde ein Herbstmaximum der partikulären AlkPA nur angezeigt, wenn diese über den POM-Gehalt normiert wurde. Die Verteilung der partikulären AlkPA-Maxima in der Ostsee war zudem komplett anders, wenn diese über den POM- oder Chl *a*-Gehalt normiert wurde, im Vergleich zu einer Normierung über die partikuläre PepA. Im Zingster Strom und in der Warnow war die Verteilung der partikulären AlkPA-Maxima zwischen den unterschiedlichen Normierungen sehr ähnlich. Jedoch unterschieden sich die Ausprägung der Maxima mit der Wahl des Normierungsparameters. So war das Frühjahrsmaximum im Zingster Strom nur dann geringer ausgeprägt als das Herbstmaximum, wenn die partikuläre AlkPA über den Chl *a*-Gehalt normiert wurde. Das Herbstmaximum in der Warnow war nur dann auf gleicher Höhe wie das Frühjahrsmaximum, wenn die partikuläre AlkPA über die partikuläre PepA normiert wurde (Abb. 3.10).

Der Normierungsparameter beeinflusst auch das Vorhandensein von linearen Zusammenhängen zwischen der partikulären AlkPA und anderen P-Limitationsindikatoren (Tabelle A7, A8, A9 und 3.4). In der Ostsee korrelierte z. B. die partikuläre AlkPA nur signifikant negativ mit dem DIP-Gehalt und signifikant positiv mit den DIN:DIP- und PP:POM-Verhältnissen, wenn diese über den POM-Gehalt normiert wurde (Tabelle A7). In der Warnow bestand zwischen dem  $K_M$  der partikulären AlkPA und der partikulären AlkPA eine signifikant negative Korrelation, aber nur wenn die AlkPA über die Bakterienabundanz normiert wurde (Tabelle A8). Im Zingster Strom korrelierte die partikuläre AlkPA nur signifikant positiv mit den PN:PP- und POC:PP-Verhältnissen, wenn diese über die partikuläre PepA oder den PP-Gehalt normiert wurde (Tabelle A9).

Auch für die Interpretation der partikulären AlkPA als P-Limitationsindikator, gemäß den Grenzwerten von Healey und Hendzel (1979a), ist die Wahl des Normierungsparameters von entscheidender Bedeutung (Abb. 3.10 und Tabelle 3.3). Im Vergleich erscheinen die Grenzwerte für die partikuläre AlkPA/Chl *a* wesentlich niedriger angesetzt zu sein als die Grenzwerte für die partikuläre AlkPA/POM, PP oder POC. In der Ostsee zeigte die partikulären AlkPA/Chl *a* eine stärkere P-Limitation an als die übrigen P-Limitationsindikator. Und auch im Zingster Strom beschrieb die partikuläre AlkPA/Chl *a* eine elfmal höhere P-Limitation als die partikuläre AlkPA/POM bzw. eine sechsmal höhere P-Limitation als die partikuläre AlkPA/PP. Nur in der Warnow fällt die partikuläre AlkPA/Chl *a* in ähnliche Kategorien wie die partikuläre AlkPA/POM und PP (Tabelle 3.3). Dies liegt vermutlich wiederum an dem höheren Chl *a*:POM-Verhältnis der Warnow im Vergleich zur Ostsee und dem Zingster Strom (Tabelle 3.1). In der Warnow sprechen die Grenzwerte für die partikuläre AlkPA/POM, Chl *a* und PP für eine mittlere P-Limitation, obwohl die PN:PP- und PP:POM-Verhältnisse keine P-Limitation anzeigen (Tabelle 3.3). Für den Zingster Strom scheinen die Grenzwerte für die partikuläre AlkPA/POM zu niedrig zu sein, da sie als einzige Parameter eine mittlere anstatt eine starke P-Limitation anzeigen. Die Grenzwerte für die partikuläre AlkPA/POC sind sehr hoch angesetzt und beschreiben weder im Zingster Strom noch in den anderen beiden Gewässern, zu keiner Jahreszeiten, eine P-Limitation (Tabelle 3.3).

Zusammenfassend hatte die Wahl des Normierungsparameters entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung der partikulären AlkPA im Vergleich zwischen den drei Gewässern und im Vergleich zwischen den Jahreszeiten. Zusätzlich ist die Interpretation der partikulären AlkPA als P-Limitationsindikator stark davon abhängig, welcher Normierungsparameter mit dem dazugehörigen Grenzwertsystem genutzt wurde.

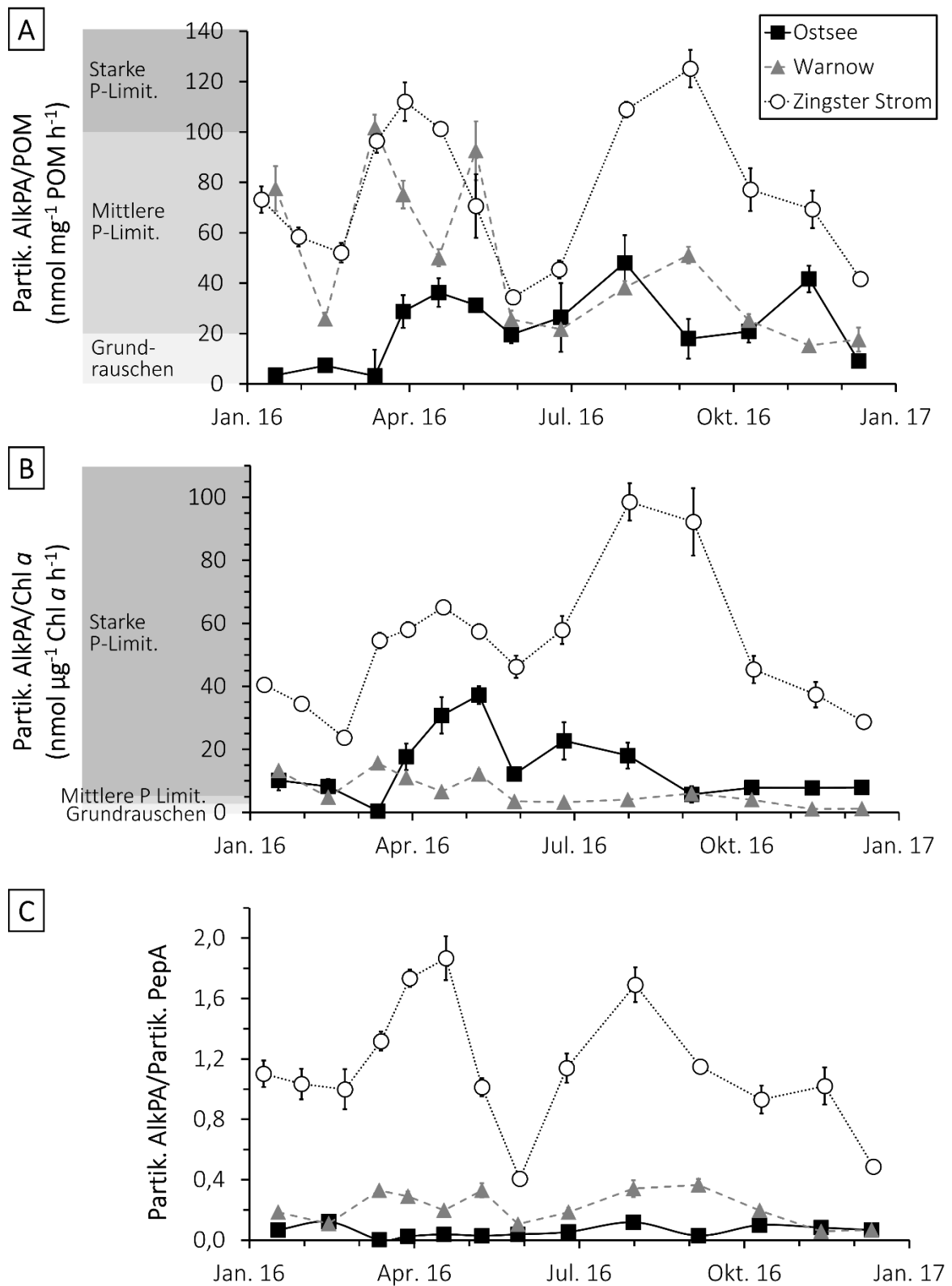


Abb. 3.10: Die partikuläre alkaline Phosphataseaktivität aller drei Gewässer im Jahresverlauf normiert über a) das partikuläre organische Material (Partik. AlkPA/POM; nmol mg<sup>-1</sup> POM h<sup>-1</sup>), b) über den Chlorophyll *a*-Gehalt (Partik. AlkPA/Chl *a*; nmol µg<sup>-1</sup> Chl *a* h<sup>-1</sup>) und c) über die partikuläre Aminopeptidaseaktivität (Partik. AlkPA/Partik. PepA); Grenzwerte gemäß Healey und Hendzel (1979a)

Tabelle 3.3: Die verschiedenen Phosphorlimitationsindikatoren im Vergleich für die Ostsee, die Warnow und den Zingster Strom zu den verschiedenen Jahreszeiten; angegeben wird der Median; Einfärbungen gemäß Grenzwerte zur Einschätzung von Nährstofflimitationen: farblos = keine P-Limitation; **gelb = mittlere N-Limitation**; **hellgrün = mittlere P-Limitation**; **dunkelgrün = starke P-Limitation**; **rosa = Parameter ohne verfügbare Grenzwerte**; Quellen siehe Tabelle A1

Gewässer	Ostsee				Warnow				Zingster Strom			
Jahreszeit	Winter	Frühling	Sommer	Herbst	Winter	Frühling	Sommer	Herbst	Winter	Frühling	Sommer	Herbst
Partik. AlkPA/POM (nmol mg <sup>-1</sup> POM h <sup>-1</sup> )	7	18	23	20	24	84	26	20	58	101	45	57
Partik. AlkPA/Chl <i>a</i> (nmol µg <sup>-1</sup> Chl <i>a</i> h <sup>-1</sup> )	8	13	20	8	4	11	4	3	34	58	58	41
Partik. AlkPA/PP (nmol µg <sup>-1</sup> PP h <sup>-1</sup> )	2,0	0,8	3,5	1,5	2,2	8,0	3,3	1,4	25	53	33	38
Partik. AlkPA/POC (nmol mg <sup>-1</sup> POC h <sup>-1</sup> )	30,3	60,0	86,1	84,3	23,6	116,9	76,7	46,6	106,2	155,3	128,1	226,5
Partik. AlkPA/Bakt. (amol Zelle <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	59,7	62,5	27,1	45,1	38,8	102,1	15,8	21,6	103,0	218,8	87,4	107,2
Partik. AlkPA/Partik. PepA (mol mol <sup>-1</sup> )	0,03	0,04	0,08	0,07	0,3	0,2	0,1	0,1	1,2	0,8	1,0	1,0
K <sub>M</sub> der partik. AlkPA (µmol l <sup>-1</sup> )	20,9	14,0	24,3	11,4	2,8	2,8	28,2	7,5	6,6	13,6	5,7	4,8
DIN:DIP (mol mol <sup>-1</sup> )	16	46	55	6	290	1692	22	38	1282	140	17	95
PN:PP (mol mol <sup>-1</sup> )	90	4	12	9	29	18	14	12	38	55	52	56
POC:PP (mol mol <sup>-1</sup> )	682	26	68	62	176	127	93	81	327	546	530	466
POC:PN (mol mol <sup>-1</sup> )	7,6	6,5	6,1	7,2	6,2	7,4	6,3	6,8	9,2	10,0	10,2	8,7
PP:POM (µmol mg <sup>-1</sup> )	0,06	1,05	0,30	0,37	0,37	0,33	0,38	0,40	0,10	0,06	0,05	0,05

Bakt. = Bakterienabundanz; Chl *a* = Chlorophyll *a*; DIN bzw. DIP = gelöster anorganischer Stickstoff bzw. Phosphor; K<sub>M</sub> = Michaeliskonstante; Partik. AlkPA = partikuläre alkaline Phosphataseaktivität; Partik. PepA = partikuläre Aminopeptidaseaktivität; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff; POM = partikuläres organisches Material; PN = partikulärer Stickstoff; PP = partikulärer Phosphor

### 3.2.2 Die alkaline Phosphataseaktivität im Vergleich mit anderen

#### Phosphorlimitationsindikatoren

Um die Eignung der partikulären AlkPA als P-Limitationsindikator zu bewerten, wurde diese gegenüber anderen P-Limitationsindikatoren aufgetragen. Die partikuläre AlkPA zeigte eine inverse hyperbolische Beziehung zu dem DIP-Gehalt (Abb. 3.11 a). Diese inverse hyperbolische Beziehung war mit dem PP-Gehalt und der partikulären PepA als Normierungsparameter ausgeprägter als mit dem Chl *a*- oder POC-Gehalt und der Bakterienabundanz (Daten nicht gezeigt). Am schlechtesten war die inverse hyperbolische Beziehung mit dem POM-Gehalt als Normierungsparameter ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). Bei einem DIP-Gehalt von über  $0,3 \mu\text{mol l}^{-1}$  war die partikuläre AlkPA/PP unter  $12 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ PP h}^{-1}$  (Abb. 3.11 a), die partikuläre AlkPA/partikuläre PepA unter  $0,4 \text{ mol mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , die partikuläre AlkPA/Chl *a*, abgesehen von einem Ausreißer, unter  $14 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a \text{ h}^{-1}$ , die partikuläre AlkPA/POM unter  $80 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ POM h}^{-1}$ , die partikuläre AlkPA/POC unter  $130 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ POC h}^{-1}$  und die partikuläre AlkPA/Bakterienabundanz unter  $0,12 \text{ fmol Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Bei einem DIP-Gehalt unter  $0,3 \mu\text{mol l}^{-1}$  wurden meist hohe, aber auch niedrige partikuläre AlkPA gemessen (Abb. 3.11 a).

Gegenüber den PN:PP- und POC:PP-Verhältnissen zeigte die partikuläre AlkPA signifikant positive Korrelationen, jedoch nur wenn die partikuläre AlkPA nicht über den POM- oder POC-Gehalt normiert wurde (Abb. 3.11 b, Tabelle 3.4). Damit nahm mit steigenden P-limitierenden Verhältnissen im Seston die partikuläre AlkPA zu. Unter sehr hohen PN:PP- und POC:PP-Verhältnissen, die eine P-Limitation anzeigen, wurden jedoch neben hohe auch wieder niedrige partikuläre AlkPA gemessen (Abb. 3.11 b).

Zu dem PP:POM-Verhältnis zeigte die partikuläre AlkPA auch eine inverse hyperbolische Beziehung. Diese war ebenfalls ausgeprägter, wenn die Normierungsparameter PP-Gehalt (Abb. 3.11 c) oder partikuläre PepA (Daten nicht gezeigt) genutzt wurden. Bei diesen beiden Normierungsparametern wurden ab einem PP:POM-Verhältnis von  $0,3 \mu\text{g PP mg}^{-1} \text{ POM}$  nur niedrige partikuläre AlkPA/PP gemessen. Unter  $0,3 \mu\text{g PP mg}^{-1} \text{ POM}$  wurden wiederum hohe und niedrige partikuläre AlkPA/PP und AlkPA/PepA dokumentiert. Mit den Normierungsparametern POM-Gehalt und Bakterienabundanz war die inverse hyperbolische Beziehung am schlechtesten ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

Mit dem DIN:DIP-Verhältnis bestand ein signifikanter Zusammenhang zu der partikulären AlkPA, wenn diese mit dem POM-Gehalt oder der Bakterienabundanz normiert wurde (Tabelle 3.4). Damit nahm mit steigender P-Limitation im Umgebungswasser die partikuläre AlkPA zu.



Mit den Normierungsparametern PP-Gehalt und partikuläre PepA, mit denen die partikuläre AlkPA die besten Übereinstimmungen mit den PN:PP-, PC:PP- und PP:POM-Verhältnissen zeigte, bestand kein Zusammenhang mit dem DIN:DIP-Verhältnis (Tabelle 3.4).

Der Vergleich des  $K_M$  der partikulären AlkPA mit anderen P-Limitationsindikatoren zeigte, dass der  $K_M$  in der Warnow schwach signifikant positiv mit dem DIP-Gehalt korrelierte (Tabelle A8, Abb. 3.12 a). Damit stieg in der Warnow die Affinität der partikulären AlkPA zu dem artifiziellen Substrat an, wenn weniger Phosphat im Umgebungswasser zur Verfügung standen. In der Ostsee und dem Zingster Strom bestand kein Zusammenhang zwischen dem  $K_M$  der partikulären AlkPA und dem DIP-Gehalt (Tabelle A7 und A9, Abb. 3.12 a). Zum N:P-Verhältnis im Seston zeigte sich nur im Zingster Strom ein signifikant positiver Zusammenhang (Tabelle A9). Die Korrelation war jedoch nur schwach und die PN:PP-Verhältnisse lagen alle im Bereich der P-Limitation (Abb. 3.12 b). Im Vergleich mit allen drei Gewässern zusammen, zeigte der  $K_M$  der partikulären AlkPA eine inverse hyperbolische Beziehung zum PN:PP-Verhältnis. Die höchsten  $K_M$ -Werte wurden im Bereich des PN:PP-Verhältnisses gemessen, der keine P-Limitation angibt. Doch auch niedrige  $K_M$ -Werte kamen unter niedrigen PN:PP-Verhältnissen vor. Zwischen dem  $K_M$  der partikulären AlkPA und dem PP:POM-Verhältnis bestand in keinem der drei Gewässer, noch wenn man alle drei Gewässern zusammen betrachtet, ein Zusammenhang (Tabelle A7, A8, A9 und 3.4, Abb. 3.12 c). Insgesamt kamen niedrige  $K_M$ -Werte unter hohen als auch unter niedrigen DIP-Gehalte, NP:PP-Verhältnissen und PP:POM-Verhältnissen vor.

Ein einheitlicher Zusammenhang zwischen der partikulären AlkPA und dem  $K_M$  bestand in den drei Gewässern nicht (Tabelle 3.4). Zwischen der partikulären AlkPA und dem  $K_M$  der Ostsee bzw. dem  $K_M$  des Zingster Stroms bestand ein signifikant positiver Zusammenhang, jedoch nur wenn die AlkPA über den PP-Gehalt bzw. über die partikuläre PepA oder Bakterienabundanz normiert wurde (Tabelle A7 bzw. A9). In der Warnow zeigte sich dagegen eine negative Korrelation zwischen dem  $K_M$  und der partikulären AlkPA, jedoch nur wenn die AlkPA in Bezug zur Bakterienabundanz gesetzt wurde (Tabelle A8). Das bedeutet, mit einer steigenden AlkPA aufgrund einer P-Limitation, sank in der Ostsee und im Zingster Strom die Affinität der partikulären AlkP<sub>asen</sub> zum artifiziellen Substrat, während in der Warnow die Affinität anstieg. Diese Zusammenhänge waren jedoch wieder von dem Normierungsparameter abhängig.

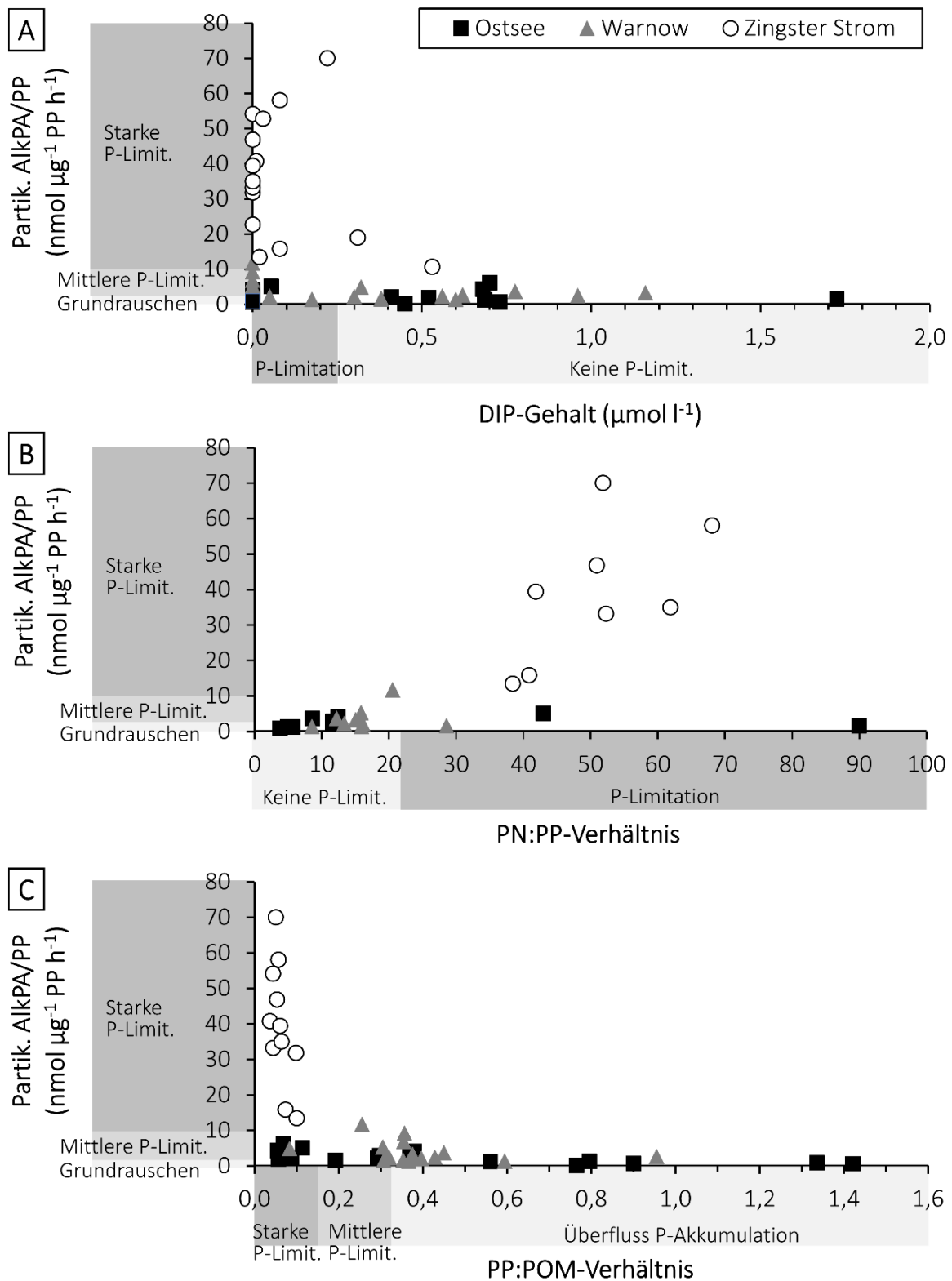


Abb. 3.11: Die partikuläre alkaline Phosphataseaktivität der drei Gewässer normiert über den partikulären Phosphorgehalt (Partik. AlkPA/PP; nmol  $\mu\text{g}^{-1}$  PP h $^{-1}$ ) gegenüber a) dem gelösten anorganischen Phosphorgehalt (DIP;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ), b) dem PN:PP-Verhältnis (mol mol $^{-1}$ ) und c) dem PP:POM-Verhältnis ( $\mu\text{mol PP mg}^{-1}$  POM); PN bzw. PP = partikulärer Stickstoff bzw. Phosphor; POM = partikuläres organisches Material; Grenzwerte gemäß Healey und Hendzel (1979a und 1980), Gage und Gorham (1985) und Siuda und Chrost (1987)

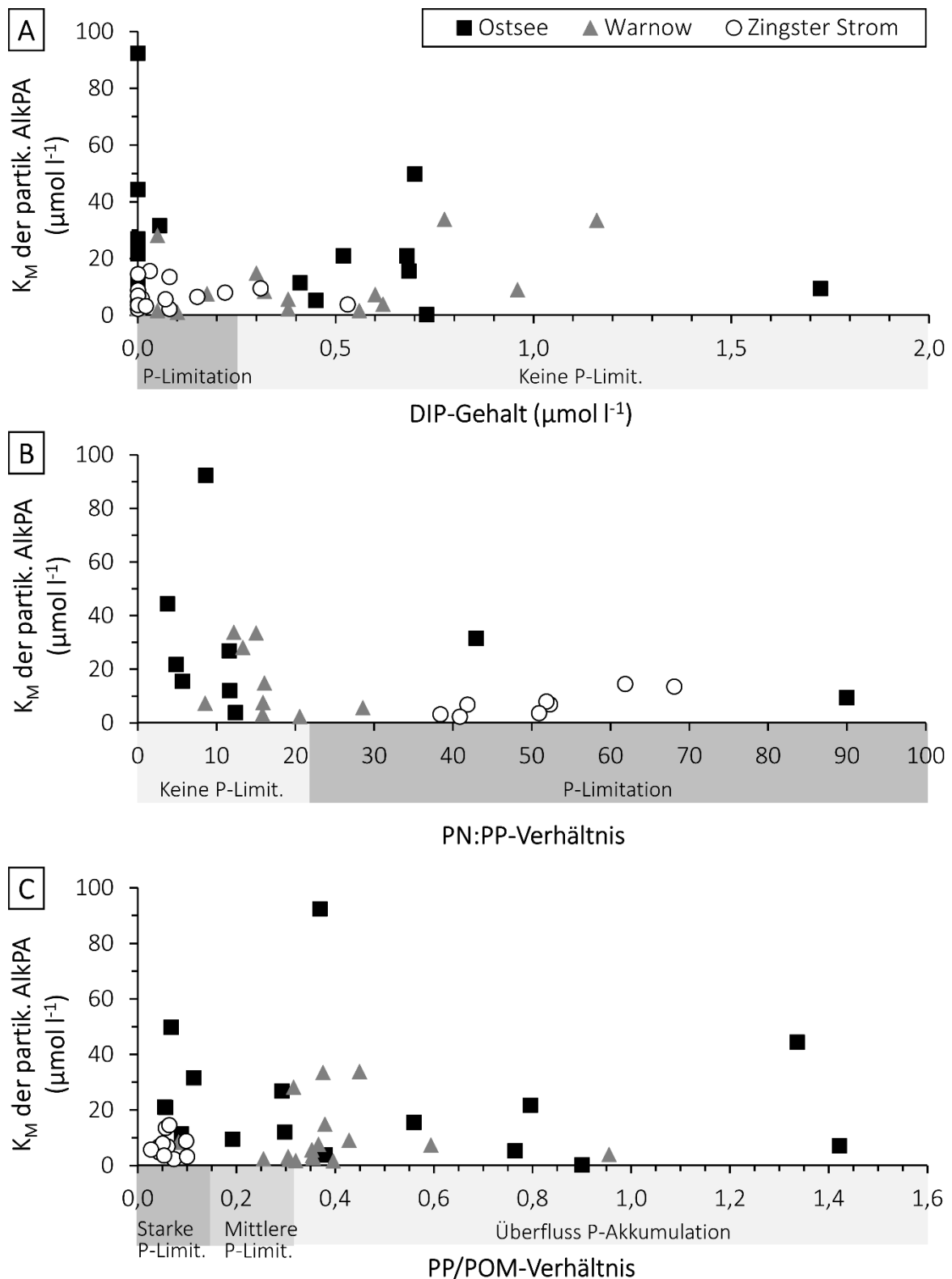


Abb. 3.12: Die Michaeliskonstante der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität ( $K_M$  der partik. AlkPA;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) der drei Gewässer gegenüber a) dem gelösten anorganischen Phosphorgehalt (DIP;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ), b) dem PN:PP-Verhältnis ( $\text{mol mol}^{-1}$ ) und c) dem PP:POM-Verhältnis ( $\mu\text{mol PP mg}^{-1} \text{POM}$ ); PN bzw. PP = partikulärer Stickstoff bzw. Phosphor; POM = partikuläres organisches Material; Grenzwerte gemäß Healey und Hendzel (1979a und 1980), Gage und Gorham (1985) und Siuda und Chrost (1987)

Tabelle 3.4: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität, unterschiedlich normiert, und verschiedenen Phosphorlimitationsindikatoren von allen drei Gewässern;  $r_s$  Korrelationskoeffizient;  $p$  Signifikanzniveau;  $n$  Probenanzahl; signifikante Korrelationen \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

		Partik. AlkPA normiert über						K <sub>M</sub> der partik. AlkPA
		Chl <i>a</i>	POM	POC	PP	Partik. PepA	Bakterien-abundanz	
DIN/DIP	$r_s$	0,084	0,497**	-0,048	0,245	0,205	0,308*	-0,274
	$p$	0,555	0,001	0,790	0,090	0,126	0,030	0,052
	$n$	52	44	34	49	57	50	51
PN/PP	$r_s$	0,451*	0,339	0,369	0,739***	0,636***	0,424*	-0,433*
	$p$	0,018	0,097	0,058	0,000	0,000	0,027	0,024
	$n$	27	25	27	27	27	27	27
POC/PP	$r_s$	0,487*	0,346	0,389*	0,755***	0,667***	0,472*	-0,461*
	$p$	0,010	0,090	0,045	0,000	0,000	0,013	0,016
	$n$	27	25	27	27	27	27	27
PP/POM	$r_s$	-0,495**	-0,127	-0,492*	-0,747***	-0,464**	-0,460**	-0,012
	$p$	0,001	0,416	0,013	0,000	0,002	0,002	0,940
	$n$	43	43	25	43	43	43	43
DIP	$r_s$	-0,451**	-0,473**	-0,404*	-0,358*	-0,220	-0,339*	0,133
	$p$	0,001	0,001	0,018	0,012	0,100	0,016	0,352
	$n$	52	44	34	49	57	50	51
DOP	$r_s$	-0,316*	0,156	-0,096	0,092	0,129	-0,171	-0,184
	$p$	0,027	0,319	0,634	0,528	0,378	0,240	0,207
	$n$	49	43	27	49	49	49	49
K <sub>M</sub> der partik. AlkPA	$r_s$	0,030	-0,254	-0,181	-0,127	-0,227	-0,144	-
	$p$	0,833	0,096	0,356	0,385	0,110	0,318	-
	$n$	51	44	28	49	51	50	-

Chl *a* = Chlorophyll *a*; DIN = gelöster anorganischer Stickstoff; DIP = gelöster anorganischer Phosphor; DOP = gelöster organischer Phosphor; K<sub>M</sub> = Michaeliskonstante; Partik. AlkPA = partikuläre alkaline Phosphataseaktivität; Partik. PepA = partikuläre Amino-peptidaseaktivität; PN = partikulärer Stickstoff; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff; POM = partikuläres organisches Material; PP = partikulärer Phosphor

Unterschieden nach Jahreszeit, besteht vor allem in der Ostsee und der Warnow eine deutliche Diskrepanz in der Bewertung des Nährstoffzustandes zwischen den verschiedenen P-Limitationsindikatoren (Tabelle 3.3). In der Ostsee lag das DIN:DIP-Verhältnis zumindest im Frühling und Sommer weit über dem Redfield-Verhältnis von 16:1 und konnte damit durchaus zu einer P-Limitation des Phytoplanktons geführt haben. Gegen eine P-Limitation im Frühling, Sommer und Herbst sprechen die Nährstoffverhältnisse im Seston. Die niedrigen PN:PP- und POC:PP-Verhältnisse und das hohe PP:POM-Verhältnis deuten im Frühjahr, Sommer und Herbst auf eine ausreichende P-Versorgung der Phytoplanktongemeinschaft. Nur im Winter weisen die PN:PP-, POC:PP- und PP:POM-Verhältnisse auf eine P-Limitation des Sestons. Gemäß der partikulären AlkPA/Chl *a* war die Phytoplanktongemeinschaft der Ostsee das ganze Jahr über stark P-limitiert. Normiert über den PP-Gehalt spricht die partikuläre AlkPA dagegen nur für eine mittlere P-Limitation, und dies nur im Winter und Sommer.

In der Warnow zeigte zumindest die partikuläre AlkPA normiert über die Normierungsparameter POM-, Chl *a*-, und PP-Gehalt ein übereinstimmendes Bild (Tabelle 3.3). Demnach war die Phytoplanktongemeinschaft der Warnow im Winter, Frühjahr und Sommer im mittleren Maße P-limitiert. Das N:P-Verhältnis im Umgebungswasser (DIN:DIP) war vor allem im Frühling sehr hoch, was zu einer P-Limitation des Phytoplanktons hätte führen können. Dagegen sprechen die Nährstoffverhältnisse im Seston im Frühling und Sommer mit niedrigen PN:PP- und POC:PP-Verhältnissen und einem hohem PP:POM-Verhältnis. Nur im Winter deuten die PN:PP- und POC:PP-Verhältnisse ebenfalls auf eine P-Limitation.

Im Zingster Strom weisen die meisten P-Limitationsindikator übereinstimmend auf eine ganzjährige, starke P-Limitation der Phytoplanktongemeinschaft (Tabelle 3.3). Die partikuläre AlkPA normiert über den POM-Gehalt ließ nur auf eine mittlere P-Limitation bzw. normiert über den POC-Gehalt auf keine P-Limitation schließen.

Zusammenfassend zeigte der Vergleich der partikulären AlkPA mit anderen P-Limitationsindikatoren kein einheitliches Bild über die Nährstoffsituation in der Ostsee und der Warnow. Und dies unabhängig davon, welcher Normierungsparameter für die partikuläre AlkPA genutzt wurde. Nur im Zingster Strom sprechen alle ermittelten P-Limitationsindikator für eine ganzjährig P-Limitation. Doch auch hier zeigten die verwendeten Parameter Unterschiede über die Stärke der P-Limitation. Diese Ergebnisse bestätigen wieder, welcher großer Einfluss die Wahl des Normierungsparameters auf die Interpretation der AlkPA hat.

### 3.3 Die Reaktion der alkalinen Phosphataseaktivität auf verschiedene Nährstoffzugaben

Zwischen dem Frühjahr und Sommer 2017 wurde der Zingster Strom erneut zu acht Zeitpunkten beprobt, um die Reaktion der AlkPA auf verschiedene Nährstoffzugaben zu untersuchen. Da die gelöste AlkPA im Zingster Strom 2016 ganzjährig vernachlässigbar klein war, wurde diese 2017 nicht erneut gemessen. Damit wurden die Auswirkungen der Nährstoffzugaben an der Gesamt-AlkPA und nicht an der partikulären AlkPA dokumentiert. Da sich die PepA als ein geeigneter Normierungsparameter für den Zingster Strom herausgestellt hatte, wurde damit die AlkPA normiert. In den Korrelationsanalysen mit verschiedenen P-Limitationsindikatoren hatte sich gezeigt, dass eine AlkPA/PepA über  $0,4 \text{ mol mol}^{-1} \text{ PepA h}^{-1}$  eine starke P-Limitation anzeigt. Zusätzlich wurde die AlkPA in Bezug zum POC-Gehalt dargestellt.

Auf die Zugabe von Nährstoffen reagierten die Zingster Strom-Proben mit einer Erhöhung des POC-Gehalts (Abb. A23). Zu den meisten Probenahmezeitpunkten war die POC-Zunahme nach der +PN Behandlung signifikant höher als mit einer +P oder +N Behandlung. Dies lässt auf eine NP-Kolimitation des Phytoplanktons schließen. Im März war die POC-Zunahme nach der +N Behandlung signifikant höher als nach der +PN Behandlung. Damit war das Phytoplanktonwachstum im März wahrscheinlich N-limitiert. Zu den beiden Probenahmezeitpunkten im Mai war die POC-Zunahme nach der +P Behandlung signifikant höher als nach den +NP und +N Behandlungen. Dies lässt auf eine P-Limitation des Phytoplanktons im Mai schließen.

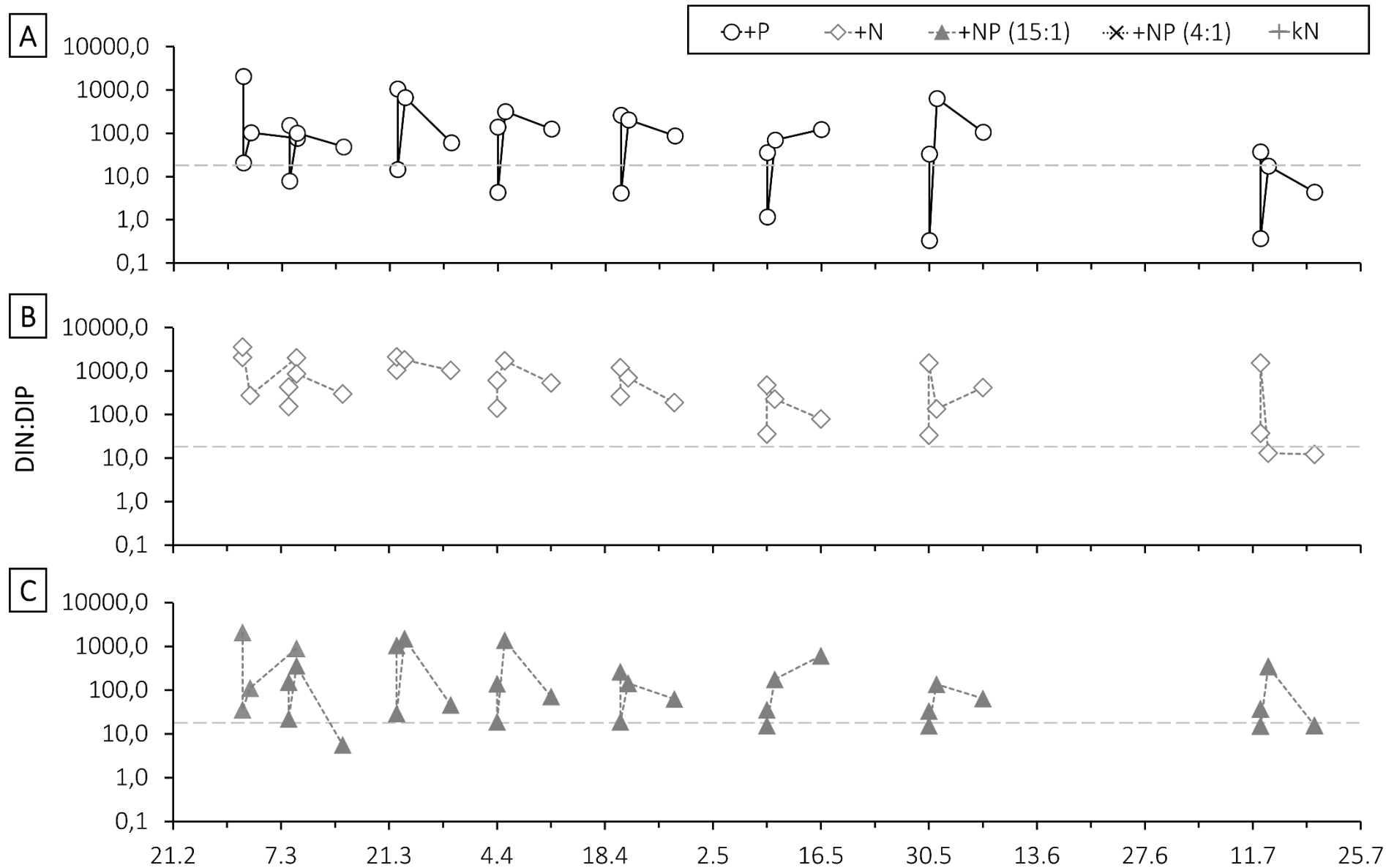
Der Chl *a*-Gehalt nahm im März mit der Nährstoffzugabe ebenfalls zu (Abb. A24). Ab dem Monat April sank der Chl *a*-Gehalt mit und auch ohne Nährstoffzugaben um bis zu 66%. Damit nahm auch das Chl *a*:Seston-Verhältniss ab (Abb. A25). Als Ausreißer ist die Probenahme vom 21.03. zu betrachten. Hier stieg der Chl *a*-Gehalt um bis zu 722% an und das Chl *a*:Seston-Verhältnis nahm um das Vierfache zu (Abb. A25; Sternchen markieren den Ausreißer). Die Zunahme des POC-Gehalts war jedoch vergleichbar mit den anderen Probenahmezeitpunkten (Abb. A23). Die Abnahme des Chl *a*-Gehalts und die Veränderungen des Chl *a*:Seston-Verhältnisses wurden vermutlich durch ein verändertes Lichtklima, im Vergleich zu den in-situ Bedingungen, verursacht. Der Chl *a*-Gehalt spiegelte damit nicht die Biomassezunahme wider und wurde daher als Normierungsparameter für die AlkPA nicht genutzt.

Nach der +P und +NP 15:1 Behandlung wurde der DIP-Gehalt meist innerhalb von 24 Stunden nahezu aufgebraucht (Abb. A26). Bei der +NP 4:1 Behandlung war die Abnahme des DIP-Gehalts zwischen den Probenahmezeitpunkten unterschiedlich. In den Nährstoffexperimenten

Anfang März und im Juli wurde der DIP-Gehalt auch nach sieben Tagen nicht aufgebraucht und lag zwischen 1,22 und 5,28  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Dagegen sank in den zwei Nährstoffexperimenten vom April und Mai der DIP-Gehalt bereits nach 24 Stunden auf unter 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Bei der +N Behandlung nahm der DIN-Gehalt umso schneller ab, je mehr Phosphat zusätzlich zugegeben wurde (Abb. A27). Damit sank der DIN-Gehalt in der +NP 4:1 Behandlung schneller als in der +NP 15:1 Behandlung und in der +NP 15:1 Behandlung schneller als in der +N Behandlung. Aufgebraucht wurde der DIN-Gehalt in den Nährstoffexperimenten vom März und April meist erst nach sieben Tagen. Im Mai bereits nach 24 Stunden. Nur beim Nährstoffexperiment im Juli nahm der DIN-Gehalt nach der +NP 4:1 Behandlung um mehr als das doppelte zu.

Vor der Zugabe von Nährstoffen lagen die DIN:DIP-Verhältnisse in allen acht Nährstoffexperimenten über dem Redfield-Verhältnis von 16:1 und zeigten damit eine P-Limitation an (Abb. 3.13). Ohne die Zugabe von Nährstoffen (kN) blieben die DIN:DIP-Verhältnisse auch in diesem Bereich. Die +P, +NP 15:1 und +NP 4:1 Behandlungen führten zu einem unterschiedlich starken Absinken der DIN:DIP-Verhältnisse. Die +N Behandlungen schoben die DIN:DIP-Verhältnisse dagegen weiter in Richtung P-Limitation. In den +P und +NP 15:1 Behandlungen stiegen die DIN:DIP-Verhältnisse, durch den starken DIP-Verbrauch, nach 24 Stunden wieder an und blieben auch nach sieben Tagen meist im Bereich der P-Limitation. In den +NP 4:1 Behandlungen stiegen die DIN:DIP-Verhältnisse nur in einigen Fällen nach 24 Stunden wieder in den Bereich der P-Limitation. Doch spätestens nach sieben Tagen fielen die DIN:DIP-Verhältnisse in die N-Limitation. Eine Ausnahme stellte das Nährstoffexperiment vom Juli dar. Hier stieg das DIN:DIP-Verhältnis mit der +NP 4:1 Behandlung nach 24 Stunden erneut in die P-Limitation und blieb auch in diesem Bereich. In den +N, +P und +NP 15:1 Behandlungen im Juli sanken die DIN:DIP-Verhältnisse dagegen, spätestens nach sieben Tagen, in die N-Limitation (Abb. 3.13).

Vor der Zugabe von Nährstoffen lag die AlkPA/PepA zu allen acht Probenahmezeitpunkte über 0,4  $\text{mol mol}^{-1} \text{PepA h}^{-1}$ , was für eine starke P-Limitation spricht (Abb. 3.14). Mit der +N Behandlung stieg die AlkPA/PepA in sieben von acht Fällen weiter an. Nur Anfang März fiel die AlkPA/PepA mit der +N Behandlung unter die Grenze einer starken P-Limitation. Die AlkPA/POC stieg in vier von acht Nährstoffexperimenten mit der +N Behandlung weiter an, während in den anderen vier Fällen die AlkPA/POC abnahm, jedoch nicht in dem Maße wie mit einer Phosphatzugabe allein (+P) oder gekoppelt mit Nitrat (+NP; Daten nicht gezeigt). Zu den beiden Probenahmezeitpunkten in denen keine Nährstoffe zugegeben wurden, nahm die AlkPA/PepA ebenfalls zu. Der Anstieg der AlkPA/PepA bzw. POC war ohne eine Nährstoffzugabe nicht so hoch wie bei der +N Behandlung.





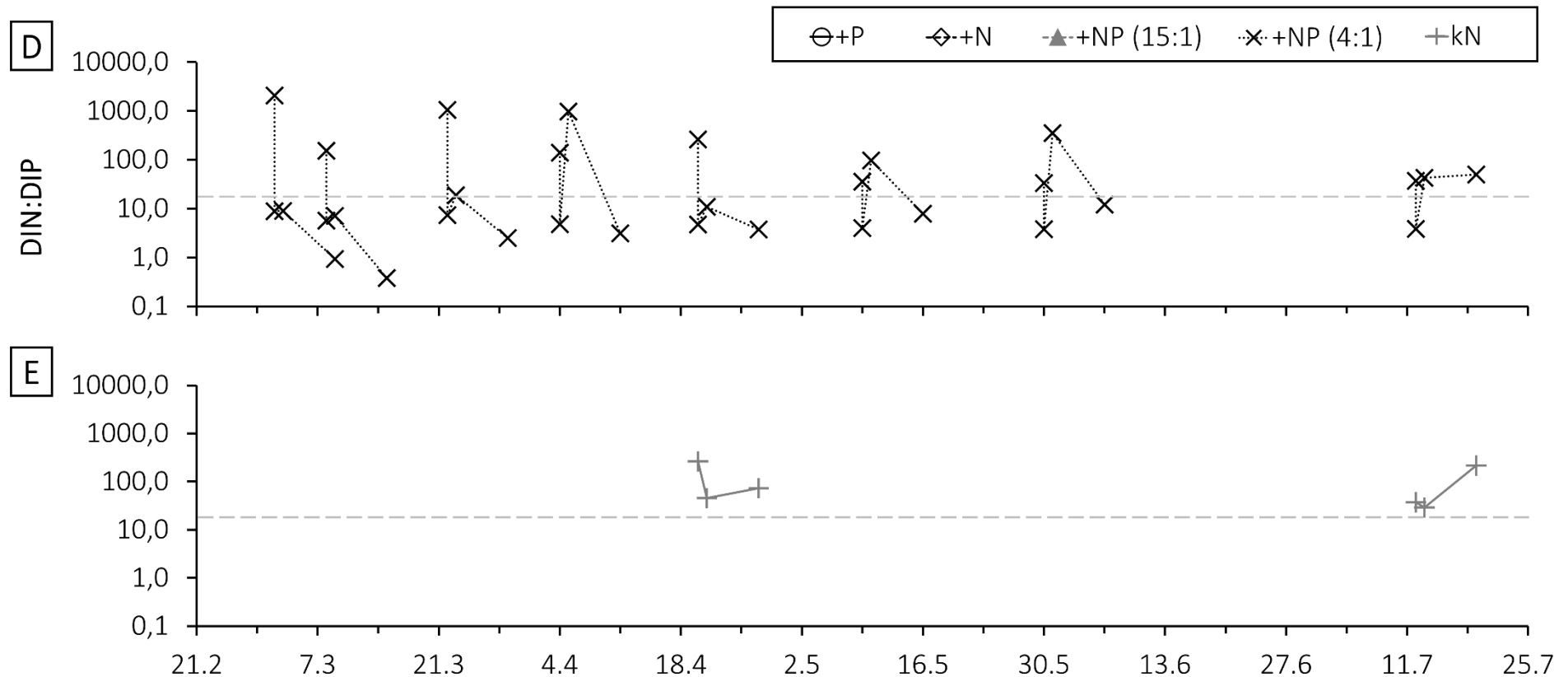


Abb. 3.13: Die Entwicklung des gelösten anorganischen Stickstoff zu Phosphorverhältnisses (DIN:DIP) in natürlichen Zingster Strom-Proben (Frühjahr bis Sommer 2017) mit der Zugabe von a) Phosphat (+P; in Form von 5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), b) Nitrat (+N; in Form von 75  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$ ), c) Phosphat und Nitrat im Verhältnis von 15:1 (+NP 15:1; in Form von 75  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  und 5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), d) Phosphat und Nitrat im Verhältnis von 4:1 (+NP 4:1; in Form von 75  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  und 20  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) und e) ohne Nährstoffzugabe (kN); die gestrichelte Linie markiert bei einem DIN:DIP-Verhältnis von 16 den Übergang von einer N-Limitation (DIN:DIP < 16) zu einer P-Limitation (DIN:DIP > 16) nach Redfield (1934)

Die Zugabe von Phosphor, allein oder in Kombination mit Nitrat, führte in allen acht Nährstoffexperimenten zu einer Abnahme der AlkPA/PepA und der AlkPA/POC. In sieben von acht Fällen sank die AlkPA/PepA in der +NP 4:1 Behandlungen bzw. in fünf von acht Fällen in den +P und +NP 4:1 Behandlungen nach sieben Tagen unter die Grenze von  $0,4 \text{ mol mol}^{-1} \text{ PepA h}^{-1}$  für eine starke P-Limitation. Das Verhalten der AlkPA/PepA und der AlkPA/POC bei der +N Behandlung war hochsignifikant unterschiedlich ( $p \leq 0,001$ ) zu den +P, +NP 15:1 und +NP 4:1 Behandlungen (Tabelle A10). Der Abfall der AlkPA/PepA und der AlkPA/POC war in der +NP 4:1 Behandlung zusätzlich signifikant höher ( $p \leq 0,05$ ) als in den +P und +NP 15:1 Behandlungen (Tabelle A10). Die AlkPA nahm damit ab, wenn Phosphat zugegeben wurde, allein oder in Kombination mit Nitrat, und nahm zu, wenn Nitrat zugegeben wurde (Tabelle 3.5).

Die  $K_M$ -Werte zeigten keine einheitliche Reaktion auf die verschiedenen Nährstoffbehandlungen (Abb. 3.15, Tabelle 3.5). Mit der +N Behandlung stieg der  $K_M$  meist an oder blieb relativ unverändert. Auf die +P, +NP 15:1 und +NP 4:1 Behandlungen stiegen die  $K_M$  an, sanken ab oder blieben relativ unverändert.

Tabelle 3.5: Die Reaktion der alkalinen Phosphataseaktivität des Zingster Stroms und des DIN:DIP-Verhältnisses auf die Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen nach sieben Tagen

Behandlung	kN	+N	+P	+NP 15:1	+NP 4:1
AlkPA/PepA	↑	↑	↓	↓	↓
AlkPA/POC	↑ oder ↓	↑ oder ↓	↓	↓	↓
$K_M$	↑	↑ oder -	↑ oder ↓	↑ oder ↓	↑ oder ↓
DIN:DIP	P-Limit.	P-Limit.	P-Limit.	P-Limit.	N-Limit.

AlkPA = alkaline Phosphataseaktivität; DIN = gelöster anorganischer Stickstoff; DIP = gelöster anorganischer Phosphor;  $K_M$  = Michaeliskonstante; PepA = Amino-peptidaseaktivität; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff; kN = keine Nährstoffzugabe; +N = Zugabe von  $75 \mu\text{M KNO}_3$ ; +P = Zugabe von  $5 \mu\text{M Na}_2\text{HPO}_4$ ; +NP = Zugabe von  $75 \mu\text{M KNO}_3$  und  $5 \mu\text{M}$  bzw.  $20 \mu\text{M Na}_2\text{HPO}_4$  im N:P-Verhältnis von 15:1 bzw. 4:1

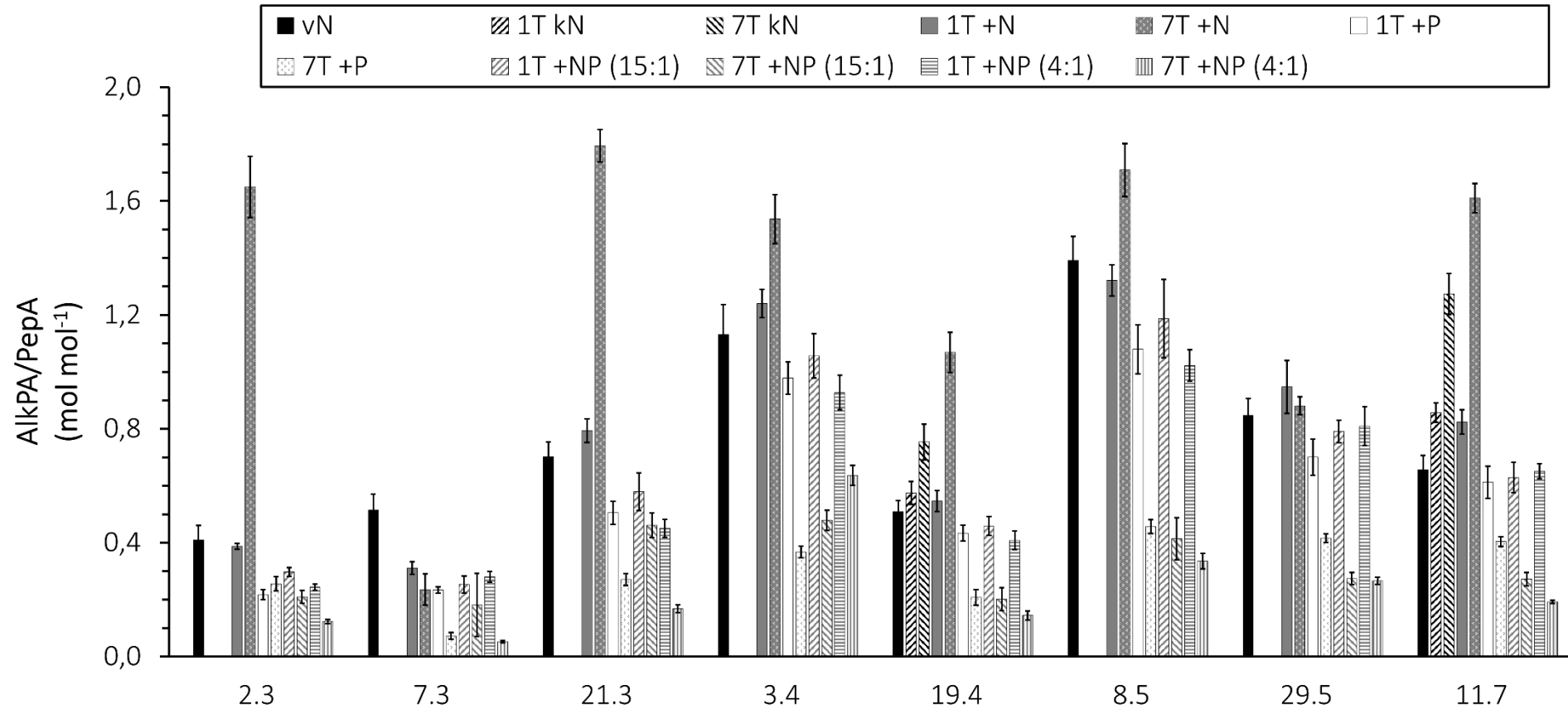


Abb. 3.14: Die Veränderung der alkalinen Phosphataseaktivität normiert durch die Aminopeptidaseaktivität (AlkPA/PepA; mol mol<sup>-1</sup>) in natürlichen Zingster Strom-Proben (Frühjahr bis Sommer 2017) mit der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen nach 24 Stunden (1T) und nach sieben Tage (7T); vN = vor der Nährstoffzugabe; kN = keine Nährstoffzugabe; +N = Zugabe von 75µM KNO<sub>3</sub>; +P = Zugabe von 5µM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; +NP = Zugabe von 75µM KNO<sub>3</sub> und 5µM bzw. 20µM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> im N:P-Verhältnis von 15:1 bzw. 4:1

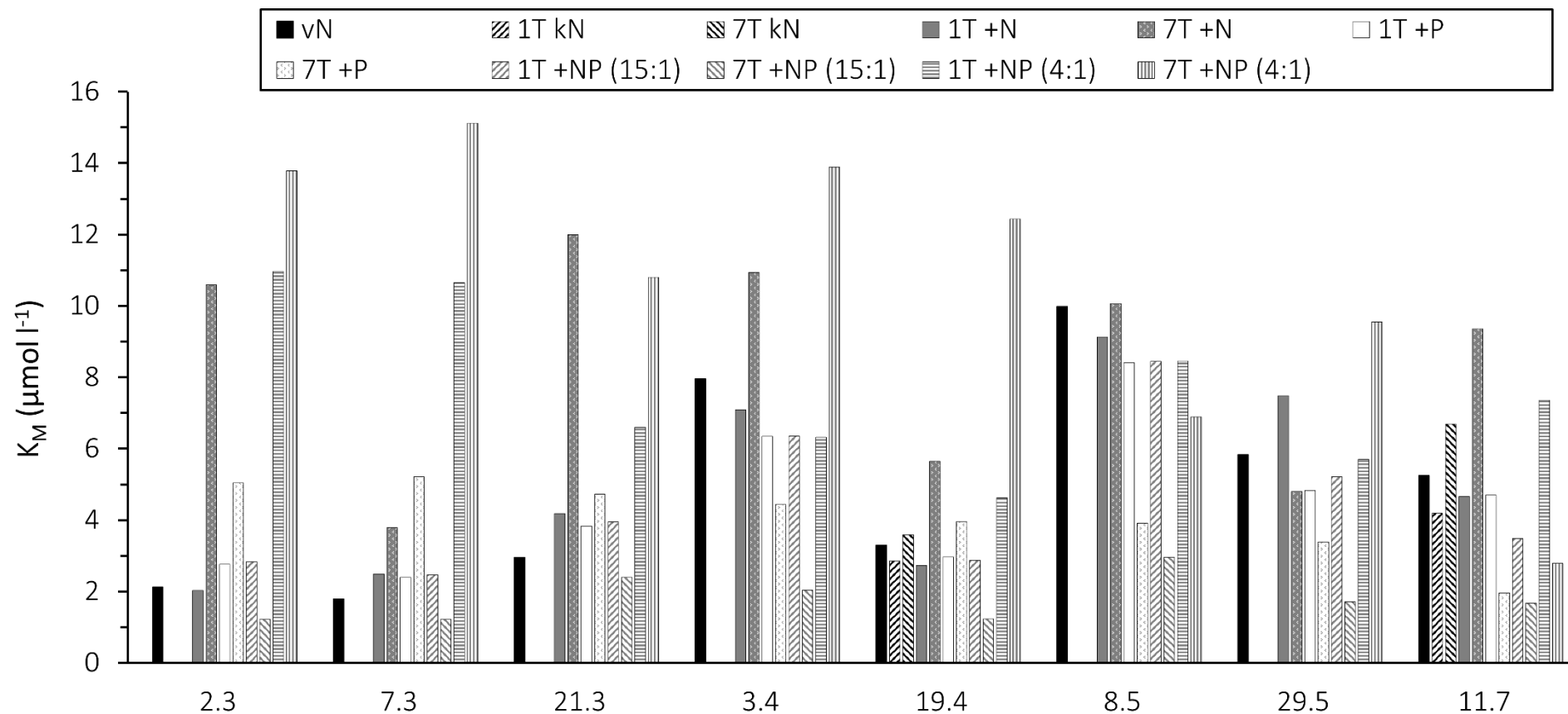


Abb. 3.15: Die Veränderung der Michaeliskonstante ( $K_M$ ) der alkalinen Phosphataseaktivität in natürlichen Zingster Strom-Proben (Frühjahr bis Sommer 2017) mit der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen nach 24 Stunden (1T) und nach sieben Tage (7T); vN = vor der Nährstoffzugabe; kN = keine Nährstoffzugabe; +N = Zugabe von  $75\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$ ; +P = Zugabe von  $5\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; +NP = Zugabe von  $75\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  und  $5\mu\text{M}$  bzw.  $20\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  im N:P-Verhältnis von 15:1 bzw. 4:1

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodische Betrachtungen

#### 4.1.1 Die Nomenklatur der Phosphorfraktionen

Die Einteilung des DP in DIP- und DOP-Verbindungen ist in der Praxis schwierig durch ungenaue analytische Messmethoden. Der DIP beinhaltet neben Orthophosphat auch Pyrophosphat, cyclische und lineare Polyphosphate sowie Phosphite (Tabelle 1.1; Lin et al. 2016). Mit dem Molybdänblau-Nachweis wird allerdings von dem DIP-Reservoir nur Orthophosphat quantitativ bestimmt. Die anderen gelösten anorganischen P-Verbindungen müssten erst in ihre einzelnen Phosphatmoleküle aufgespalten werden, um mit dieser Messmethode miterfasst zu werden. Außerdem können, durch die chemische Hydrolyse im Säuren, auch Säure-labile organische P-Verbindungen mitgemessen werden (Tarapchak et al. 1982; Karl und Björkman 2014; Nagul et al. 2015). Das DOP-Reservoir wird standardmäßig ebenfalls über den Molybdänblau-Nachweis bestimmt, nachdem der DP-Gehalt durch einen oxidativen Aufschluss im alkalischen gespalten, und die gebundenen Phosphatgruppen in freies Orthophosphat umgewandelt wurden. Berechnet wird der DOP durch die Subtraktion von DP und DIP. Bei dem oxidativen Aufschluss werden nicht nur organische, sondern auch anorganische P-Verbindungen wie Pyrophosphate, Polyphosphate und Phosphite gespalten. Daher wird das DOP-Reservoir überbestimmt und enthält Anteile des DIP-Reservoirs. Felgentreu et al. (2018) schlugen aufgrund dieser methodischen Probleme eine neue Nomenklatur der verschiedenen P-Fractionen vor. Demnach sollte die mit dem Molybdänblau-Nachweis gemessene P-Fraktion als gelöster reaktiver Phosphor (DRP) bezeichnet werden. Die Differenz aus der DRP-Fraktion und der mittels Molybdänblau-Methode gemessenen P-Fraktion nach dem oxidativen Aufschluss sollte als gelöster nicht-reaktiver Phosphor (DNP) bezeichnet werden (Felgentreu et al. 2018). In dieser Dissertation wurden die alten Bezeichnungen verwendet. Jedoch muss im Hinterkopf behalten werden, was genau hinter den jeweiligen Begriffen steckt.

#### 4.1.2 Die Messung der alkalinen Phosphataseaktivität

In natürlichen Wasserproben werden mit der Messung der AlkPA nicht einzelne Enzyme gemessen, sondern vielmehr ein Gemisch verschiedener  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  mit unterschiedlicher Herkunft. Der gemessene  $V_{\text{max}}$  entspricht dabei der Summe der  $V_{\text{max}}$  aller vorhandenen Enzyme, welche das verwendete Substrat spalten. Die Höhe von  $V_{\text{max}}$  ist neben der Anzahl der vorhandenen

Enzyme von der Temperatur, dem pH und der Substratkonzentration während der Messung abhängig. Bei konstant gehaltenen Temperatur- und pH-Bedingungen und einer Substratkonzentration, bei der alle Enzyme gesättigt sind, ist der gemessene  $V_{\max}$  äquivalent zur Menge der vorhandenen Enzyme. Die Ergebnisse der Temperatur- und pH-Experimente zeigten, dass  $V_{\max}$  und  $K_M$  stark von den Messbedingungen abhängig sind (Abb. A27). Die Vergleichbarkeit der eigenen Ergebnisse mit anderen Studien wird durch die Anwendung verschiedener Methoden und Messbedingungen erschwert (Hoppe 2003). So wurden z. B. verschiedene Substrate genutzt, und zwar unter Enzym-sättigenden Substratkonzentrationen oder unter Substratkonzentrationen, die in-situ vorkommen (Sebastián et al. 2004). Die pH- und Temperatur-Einstellungen variieren zwischen den optimalen Bedingungen für die Enzymaktivität und denen wie sie in-situ vorkommen. Bei einem Vergleich verschiedener Studien müssen die Messbedingungen daher mitbetrachtet werden (Tabelle 4.1 und 4.2).

Bereits in der Einleitung wurde die Möglichkeit erläutert, dass mit den Substraten zur Messung der AlkPA, aufgrund ihres hydrophoben Charakters, auch intrazelluläre Acid- und AlkPA mitgemessen werden könnten. Es wurde jedoch keine Studie gefunden, in der diese Möglichkeit in Betracht gezogen wird. Berman (1970) maß die AlkPA mit dem Substrat *p*-NPP nach der Methode von Reichardt et al. (1967), welche er mit der Zugabe von Chloroform modifizierte. Berman (1970) beobachtete unter dem Mikroskop den Zerfall der Zellmembranen und der Zellwände der Phytoplankter nach der Behandlung mit Chloroform. Dennoch unterschied sich die AlkPA zwischen einer Chloroform-unbehandelten Probe und einer Chloroform-behandelten Probe nicht im Geringsten. Auch zermahlene Phytoplanktonzellen unterschieden sich in ihrer AlkPA nicht von intakten Phytoplanktonzellen (Berman 1970). Die Schlussfolgerung, dass das Substrat *p*-NPP membrangängig ist, wurde von Berman (1970) jedoch nicht gezogen. Hernandez und Whitton (1996) beobachteten bei Messungen der zellgebundenen AlkPA in *Fucus spiralis* L. mit den Substraten *p*-NPP und MUF-P, die Freisetzung der Produkte *p*-Nitrophenol (*p*-NP) und MUF von dem Algengewebe in das Medium, nachdem die Routinemessungen abgeschlossen waren und die Gewebethalli ausgiebig gewaschen worden waren. Diese Studie spricht auch dafür, dass diese beiden Substrate membran-gängig sind. Damit würden intrazelluläre AlkP<sub>asen</sub> mitgemessen werden, die niedermolekulare DOP-Moleküle im Zellinneren abbauen. Aber auch intrazelluläre, konstitutive AcidP<sub>asen</sub> würden mitbestimmt werden. Jedoch nicht im gleichen Umfang wie die AlkP<sub>asen</sub>, da die AlkPA-Messungen im alkalischen Milieu durchgeführt werden, in welchem die AcidP<sub>asen</sub> nicht optimal katalytisch arbeiten. Im sauren pH-Bereich würde die AcidPA in höherem Maße mitgemessen werden. Und

tatsächlich zeigte sich im pH-Experiment, dass  $V_{\max}$  mit sinkendem pH-Wert anstieg (Abb. A27).

Der  $K_M$  beschreibt in einer Enzymreaktion die Bindungsaffinität eines einzelnen Enzyms zu dem jeweiligen Substrat. Bei den meisten genutzten Methoden zur Messung der AlkPA werden artifizielle Substrate genutzt, um die Aktivität eines unbekannt diversen Enzymgemischs zu quantifizieren. Die Nutzung des  $K_M$ , der an einem Gemisch von Enzymen ermittelt wird, die alle das gleiche artifizielle Substrat hydrolysieren, ist jedoch biochemisch nicht korrekt (Jansson et al. 1988). Jansson et al. (1988) vermuteten, dass die resultierende Michaelis-Menten-Kurve das Enzym mit dem kleinsten  $K_M$  und dem höchsten  $V_{\max}$  repräsentiert. Die größenfraktionierten AlkPA-Messungen ergaben jedoch ein anderes Bild (Abb. 3.4 und Tabelle 3.2). Die  $K_M$ -Werte der Größenfraktion  $< 0,2 \mu\text{m}$  waren meist niedriger als die  $K_M$ -Werte der Vollprobe. Die resultierenden  $K_M$ -Werte der Vollprobe scheinen vielmehr ein mittlerer Wert zu sein, der aus kleinen und großen  $K_M$  verschiedener AlkP<sub>asen</sub> resultiert (siehe Kapitel 3.1.3). Labry et al. (2005) maß die AlkPA in der Vollprobe und in dem  $< 0,2 \mu\text{m}$  und  $< 1 \mu\text{m}$  Filtrat und berechnete daraus die AlkPA in den  $0,2 - 1 \mu\text{m}$  und  $> 1 \mu\text{m}$  Größenfraktionen. Die kalkulierten  $K_M$ -Werte der  $< 0,2 \mu\text{m}$  und der  $0,2 - 1 \mu\text{m}$  Größenfraktionen waren meist niedriger als die  $K_M$ -Werte der  $> 1 \mu\text{m}$  Größenfraktion und der Vollprobe (Tabelle 4.1). Auch bei Labry et al. (2005) scheinen die  $K_M$ -Werte der Vollprobe ein mittlerer Wert aus den  $K_M$ -Werten der verschiedenen Größenfraktionen zu sein. Chróst und Overbeck (1987) bestimmten die  $K_M$ -Werte einzelner Größenfraktionen direkt durch die Filtration der Planktonproben durch geeignete Filter. Die Filter wurden in steril-filtrierte und autoklavierte Seewasser inkubiert und darin die AlkPA gemessen. Damit wurde bei Chróst und Overbeck (1987) die AlkPA direkt in der entsprechenden Größenfraktion gemessen und nicht, wie in dieser Studie und wie bei Labry et al. (2005), berechnet durch die Subtraktion von  $V$  der verschiedenen Filtrate (siehe Kapitel 3.1.3). Chróst und Overbeck (1987) beschrieben für die Vollprobe niedrigere  $K_M$ -Werte als für die verschiedenen Größenfraktionen (Tabelle 4.1). Ob generell bei jeder Messung der  $K_M$  der Vollprobe niedriger war als der  $K_M$  der verschiedenen Größenfraktionen wurde jedoch nicht angegeben. Da die Berechnung des  $K_M$  für die einzelnen Größenfraktionen mit den Daten aus den Filtrat-Messungen problematisch war, sollten diese immer wie bei Chróst und Overbeck (1987) beschrieben, ermittelt werden.

Die AlkPA wird mit artifiziellen Substraten gemessen (Perry 1972; Berman et al. 1990; Hoppe 1993). AlkP<sub>asen</sub> besitzen zu diesen artifiziellen Substraten eine andere Affinität als zu natürlichen Substraten (Quisel et al. 1996; Hallmann 1999). Ein Vergleich verschiedener Studien

zeigt, dass die Größenordnung der gemessenen  $K_M$ -Werte von der Wahl des Substrates abhängig ist (Tabelle 4.1). Besonders hohe  $K_M$  kommen in Studien vor, welche die AlkPA mit dem artifiziellen Substrat *p*-NPP gemessen haben. *Chlamydomonas reinhardtii* in Kultur hatte  $K_M$ -Werte zwischen 34 und 55  $\mu\text{mol l}^{-1}$  mit dem Substrat *p*-NPP, dagegen einen  $K_M$  von 1,4  $\mu\text{mol l}^{-1}$  mit dem Substrat MF-P und  $K_M$ -Werte zwischen 120 und 262  $\mu\text{mol l}^{-1}$  mit verschiedenen natürlichen Substraten (Tabelle 4.1; Lien und Knutsen 1973; Healey und Hendzel 1979a; Quisel et al. 1996). Die AlkP<sub>ase</sub> von *Volvox carteri* f. *nagariensis* zeigte die höchste Affinität zu den Substraten *p*-NPP ( $K_M$  von 30  $\mu\text{M}$ ), Glycerophosphat sowie Phosphoenolpyruvat und eine geringe Affinität zu den Substraten Ribose-5-phosphat, Phosphorylcholin, *o*-Phospho-L-tyrosin, AMP und NADPH (Hallmann 1999). Das Ausmaß einer Enzymhemmung mit Phosphat wird auch maßgeblich von den genutzten Substraten beeinflusst. Štrojsová et al. (2003) zeigte, dass die Phosphatkonzentration, welche eine 50%ige Hemmung der AlkP<sub>asen</sub> bewirkte, bei 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$  für das Substrat ELF®97-P (Enzymmarkierendes Fluoreszenz-Substrat®97-Phosphat) bzw. bei 30  $\mu\text{mol l}^{-1}$  für das Substrat MUF-P lag. Dies beruhte auf unterschiedlichen  $K_M$ -Werte für die beiden Substrate (Tabelle 4.1). Die AlkP<sub>asen</sub> zeigten gegenüber dem Substrat MUF-P eine höhere Affinität, wodurch Phosphationen leichter von der aktiven Bindungsstelle der AlkP<sub>asen</sub> kompetitive vertrieben wurden. Eine 50%ige Hemmung erforderte daher mit dem MUF-P als Substrat quantitative mehr Phosphationen. Um die AlkPA-Hemmung für die unterschiedlichen  $K_M$ -Werte zu korrigieren, wurden die Inhibitor-Konstanten ( $K_i$ ) berechnet. Die Inhibitor-Konstanten (ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Inhibitor) waren für beide Substrate wiederum sehr ähnlich (Štrojsová et al. 2003).

Die genutzten maximalen Substratkonzentrationen bei der AlkPA-Messung haben auch entscheidenden Einfluss auf die Höhe des  $K_M$ . Sebastián et al. (2004) verglichen verschiedene Studien miteinander, mit dem Hauptaugenmerk auf den genutzten maximalen Substratkonzentrationen. Studien, die niedrige maximale Substratkonzentrationen, vergleichbar mit den in-situ DOP-Konzentrationen verwendeten, beschrieben sehr viel kleinere  $K_M$ -Werte als Studien, die große maximale Substratkonzentrationen nutzten, welche für das Enzym in sättigenden Konzentrationen vorlagen (Sebastián et al. 2004). Neben einphasigen Michaelis-Menten-Kurven werden auch solche mit zwei- und dreiphasige Kinetiken berichtet. Rivkin und Swift (1980) zeigten für *Pyrocystis noctiluca* eine AlkPA mit drei klar unterscheidbaren Phasen. Für jede Phase wurde ein  $K_M$  ermittelt, welcher mit den verwendeten steigenden Substratkonzentrationen größer wurde (Tabelle 4.1). Bogé et al. (2012) beschrieben in natürlichen Phytoplanktongemeinschaften im Mittelmeer eine zweiphasige AlkPA, eine mit einer niedrigen und eine mit einer hohen Affinität zu dem verwendeten Substrat (Bogé et al. 2012; Bogé et al. 2017;



Tabelle 4.1). Mehrphasige AlkPA können durch mehrere verschiedene AlkP<sub>asen</sub> zustande kommen, deren Affinität zum verwendeten Substrat so unterschiedlich sind, dass dies in den Michaelis-Menten-Kurven der Gesamtheit erkennbar wird. Mehrphasige Michaelis-Menten-Kurven können aber auch von einem einzelnen Enzym stammen. Simpson und Vallee (1970) charakterisierten eine AlkP<sub>ase</sub> von *Escherichia coli*. Diese AlkP<sub>ase</sub> besaß zwei aktive Bindungsstellen welche unterschiedliche K<sub>M</sub>-Werte aufwiesen. Eine Bindungsstelle mit einer hohen und eine mit einer niedrigen Affinität zu dem getesteten Substrat (Simpson und Vallee 1970).

Der K<sub>M</sub> hängt neben der Wahl und der Konzentration des Substrats auch von der Berechnungsmethode ab (Atkins und Nimmo 1975). Mateo et al. (2010) berechneten V<sub>max</sub> und K<sub>M</sub> der AlkPA von vier verschiedenen Algenarten aus dem Fluss Muga (Spanien) mit drei verschiedenen Transformations-Methoden, und zwar mit dem Lineweaver-Burk-Diagramm (1/V versus 1/Substratkonzentration), dem Eadie-Hofstee-Diagramm (V versus V/Substratkonzentration) und dem Hanes-Woolf-Diagramm (Substratkonzentration/V versus Substratkonzentration). Die K<sub>M</sub>-Werte waren sehr unterschiedlich und reichten z. B. für *Nostoc verrucosum* von 30,6 bis 112,1 µmol l<sup>-1</sup> (Mateo et al. 2010; Tabelle 4.1). Auch Sebastián et al. (2004) verglichen zwei verschiedene Berechnungsmethoden für die Ermittlung des K<sub>M</sub> miteinander. Eine direkte nicht-lineare Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung und die Li-Parametrisierung (Li 1983), die eine bessere Anpassung bei niedrigen Substratkonzentrationen liefert. Die K<sub>M</sub>-Werte berechnet mit der Li-Parametrisierung, waren meist sehr viel niedriger, als die K<sub>M</sub>-Werte berechnet mit der nichtlinearen Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung (Sebastián et al. 2004; Tabelle 4.1).

Der K<sub>M</sub> hängt damit von der Temperatur, dem pH-Wert, dem verwendeten Substrat, den genutzten Substratkonzentrationen und der Berechnungsmethode ab. Dies erschwert die Vergleichbarkeit verschiedener Studien erheblich.

Tabelle 4.1: Der Vergleich der Michaeliskonstante der alkalinen Phosphataseaktivität zwischen verschiedenen Organismen und Gewässern

Algenart Gewässer Besonderheiten	Substrat Temperatur pH	K <sub>M</sub> (μmol l <sup>-1</sup> )	Quelle
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,2 – 100 μM MF-P	1,4	Healey und Hendzel 1979a
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	35°C	1,8	
<i>Anabaena variabilis</i>	pH 8,5	0,7	
<i>Pseudanabaena catenate</i>		1,1	
<i>Cyptomonas erosa</i>		3,0	
<i>Ochromonas vallesiaca</i>		2,4	
<i>Melosira granulata</i> in Kultur		1,9	
Ostsee, mesotroph	1 – 250 μM MUF-P	3,5 – 60,0	Eigene Daten
Fluss Warnow, meso-eutroph	21°C; pH 8,2	1,0 – 28,3	
Lagune Zingster Strom, eu-hypertroph		1,8 – 14,6	Müller 2012
Lagune Zingster Strom, Deutschland	5 – 100 μM MUF-P 23°C; pH 8,2	2 – 17	
<i>Nodularia</i> sp.	1 – 20 μM MUF-P		Degerholm et al. 2006
Nicht P-Limitiert	20°C	1,2 – 7,7	
P-Limitiert	pH 10,8	1,0 – 1,7	
<i>Aphanizomenon</i> sp.			
Nicht P-Limitiert		12,1	
P-Limitiert in Kultur aus der Ostsee		3,5 – 26,8	
Plußsee, Deutschland, natürlich eutroph	10 – 200 μM MUF-P		Chróst und Overbeck 1987
Gesamt AlkPA	20°C	11,8 – 59,6	
Algenfraktion (> 3 μm)	in-situ pH 7 – 9,5	31 – 47,7	
Bakterienfraktion (0,2 – 3 μm)		19,5 – 35,7	
Gelöste Fraktion (< 0,2 μm)		24,5 – 65,2	
Plußsee, Deutschland	10 – 500 μM MUF-P	18,7 – 31,2	Chróst et al. 1989
Euphotische Zone	in-situ 4 – 18°C pH 10,5		
Adria & Straße von Messina, Mittelmeer	0,1 – 20 μM MUF-P	4 – 125	Caruso 2010
Oligo-mesotroph	in-situ Temp. & pH		
Golf von Biskaya, Flussfahne des Gironde Ästuars	0,5 – 250 μM MUF-P		Labry et al. 2005
Vollprobe	in-situ 10 – 17°C	0,43 – 9,72	
Gelöste Fraktion (< 0,2 μm)	in-situ pH	1,0 – 7,87	
Bakterienfraktion (0,2 – 1 μm)		2,09 – 3,19	
Phytoplanktonfraktion (> 1 μm)		0,19 – 13,2	
Bucht von Toulon, Mittelmeer	0,037 – 30 μM MUF-P		Bogé et al. 2017
<b>Zweiphasige AlkPA</b>			
Hochaffine AlkPA	20°C	0,01 – 3,2	
Niedrigaffine AlkPA	in-situ pH	0,5 – 90	Štrojsová et al. 2003
Římov Reservoir, Tschechische Republik, eutroph, Epilimnion	MUF-P (μM nicht angegeben)	0,5	
	in-situ Temp. & pH ELF®97-P; 25°C	20	
Nordwest-Atlantik	0 – 25 μM MUF-P		Sebastián et al. 2004
Li-Parametrisierung (siehe Text)	in-situ Temp.	0,06; 0,3; 0,03	
Michaelis-Menten-Gleichung	in-situ pH	1,1; 1,9; 0,02	

Tabelle 4.1: Fortsetzung

Algenart Gewässer Besonderheiten	Substrat Temperatur pH	K <sub>M</sub> (μmol l <sup>-1</sup> )	Quelle
<i>Emiliania huxleyi</i> in Kultur Aus nativem Proteingel gereinigte AlkP <sub>ase</sub> „EHAP1“	0,05 – 15 μM DiF-MUF-P pH 8,2	1,1	Xu et al. 2010
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> in Kultur AlkPA AcidPA	<i>p</i> -NPP (μM nicht angegeben); 38°C pH 9,0 pH 5,0	55 50	Lien und Knutsen 1973
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> in Kultur	<i>p</i> -NPP (μM nicht angegeben) natürliche Substrate 37°C pH 8,5	34 – 48 120 – 262	Quisel et al. 1996
<i>Chaetoceros affinis</i> var. <i>willei</i> in Kultur	<i>p</i> -NPP (μM nicht angegeben) 20°C pH 8,3 pH 9,7	20 25	Møller et al. 1975
Freilandproben, Fluss Muga, Spanien <i>Rivularia biasolettiana</i> <i>Schizothrix coriacea</i> <i>Tolypothrix distorta</i> var. <i>penicillata</i> <i>Nostoc verrucosum</i>	10 – 400 μM <i>p</i> -NPP 20°C pH 8,5	34,4 – 85,5 34,8 – 80,7 52,0 – 88,7 30,6 – 112,1	Mateo et al. 2010
AlkPA berechnet nach drei verschiedenen Methoden; angegeben sind Min. – Max.-Werte			
<i>Pyrocystis noctiluca</i> ; <b>Dreiphasige AlkPA</b> 1. Phase 2. Phase 3. Phase	30°C; pH 8,7 0,1 – 6 μM <i>p</i> -NPP 6 – 60 μM <i>p</i> -NPP 60 – 222 μM <i>p</i> -NPP	2,8 11,1 32	Rivkin und Swift 1980
<i>Chlamydomonas acidophila</i> (intrazelluläre und Zellwand-gebunden Phosphatasen) AlkP <sub>ase</sub> AcidP <sub>ase</sub>	250 – 2000 μM <i>p</i> -NPP; 37°C pH 9,0 pH 5,0	1200 – 5000 2000 – 4600	Boavida und Heath 1984
Von <i>Daphnia magna</i> freigesetzte AlkP <sub>ase</sub> AcidP <sub>ase</sub> in Kultur	pH 9,0 pH 5,0	310 450	
Plußsee, Deutschland, gelöste AlkPA <i>Pseudoanabaena galeata</i> <i>Oscillatoria rubescens</i>	0,33 – 330 μM <i>p</i> -NPP 27°C pH 8,9	1,09 54 500	Reichardt et al. 1967

AcidPA = saure Phosphataseaktivität; AcidP<sub>asen</sub> = saure Phosphomonoesterasen; AlkPA = alkalinen Phosphataseaktivität; AlkP<sub>asen</sub> = alkaline Phosphomonoesterasen; K<sub>M</sub> = Michaeliskonstante; P = Phosphor; Substrat für AlkPA-Messung: DiFMUF-P = 6,8- Difluoro-4-Methylumbelliferyl-Phosphate; ELF®97-P = Enzymmarkierendes Fluoreszenz-Substrat®79-Phosphat; MF-P = *o*-Methylfluorescein-Phosphat, MUF-P = 4-Methylumbelliferyl-Phosphat, *p*-NPP = *p*-Nitrophenolphosphat

Die Ergebnisse der größenfraktionierten AlkPA-Messungen im Zingster Strom (Abb. 3.1 c) werfen einige Fragen auf. Dort dominieren gelatinöse koloniebildende Cyanobakterien der Gattung *Cyanobium* (Synechococcales) und gelatinöse koloniebildende Chlorophyten wie *Tetrastrum*, *Oocystis* und *Scenedesmus* das Phytoplankton (Karsten et al. 2003; Schumann et al. 2009; Albrecht et al. 2017). Bis zu 2/3 der Biomasse können von Koloniebildnern gestellt werden und das organische Partikelvolumen im Zingster Strom besteht zu 60 bis 87% aus schleimigem Material (Schumann et al. 2009; Schumann et al. 2001). Ein geringerer P-Bedarf der gelatinösen Kolonien im Vergleich zu den Einzelzellen ist eher unwahrscheinlich, da die Schleimhüllen die Diffusion von Phosphat beschränken und eher eine erhöhte P-Limitation induzieren (Schumann et al. 2009). Warum also war die AlkPA der Größenfraktion 0,2 – 1 µm im Zingster Strom immer höher als die AlkPA der höheren Größenfraktionen? Möglicherweise stellen die Schleimhüllen um die Kolonien eine Barriere für das artifizielle Substrat MUF-P dar. Dadurch würden die AlkPA innerhalb der Kolonien nicht oder nur im geringeren Anteil mitgemessen werden. Wenn die solitären Picocyanobakterien (Größenfraktion 0,2 – 1 µm) bereits eine hohe P-Limitation aufweisen, müsste der P-Bedarf innerhalb der koloniebildenden Cyanobakterien (Größenfraktionen > 1 µm) noch viel höher sein. Das würde bedeuten, dass die partikuläre AlkPA im Zingster Strom stark unterbestimmt ist. Da das genutzte Substrat MUF-P schlecht wasserlöslich ist und nur durch die Zugabe von Ethanol in Lösung gebracht werden kann, ist die Unpassierbarkeit dieses Substrats durch Schleimhüllen sehr wahrscheinlich.

Auffallend ist auch der geringe Anteil der gelösten AlkPA an der Gesamt-AlkPA im Zingster Strom (Abb. 3.1 c). Müller (2012) ermittelte vom Juli bis November 2011 im Zingster Strom ebenfalls einen Anteil von 2 bis 19% der gelösten AlkP<sub>asen</sub> an der Gesamt-AlkPA. Das Zingster Strom Phytoplankton ist das ganze Jahr über dominiert von Cyanobakterien aus der Gruppe der Synechococcales, vor allem *Cyanobium* Arten (Albrecht et al. 2017). Cyanobakterien können mehrere verschiedene AlkP<sub>ase</sub>-Genfamilien besitzen, jedoch kommt *PhoX* am häufigsten vor (Moore et al. 2005; Luo et al. 2009; Lin et al. 2018). Im *Cyanobium* sp. PCC7001 wurden gemäß Lin et al. (2018) nur *PhoX* Gene gefunden, welche zu 53% gelöste AlkP<sub>asen</sub> kodieren (Luo et al. 2009). Daher sollte man annehmen, dass durch die dominierende Anzahl an Cyanobakterien, die vor allem über *PhoX* AlkP<sub>asen</sub> verfügen, welche hauptsächlich gelöste AlkP<sub>asen</sub> sind, im Zingster Strom der Anteil der gelösten AlkPA an der Gesamt-AlkPA höher ausfällt. Diese Diskrepanz könnte erneut an dem hohen Vorkommen von Schleimhüllen liegen, die Cyanobakterien- und einige Chlorophyceen um ihre Zellkolonien bilden (Karsten et al. 2003; Schumann et al. 2001). AlkP<sub>asen</sub> sind große Proteine mit einer molekularen Masse

zwischen 75 und 145 kDa (Ray et al. 1991; Xu et al. 2010). Möglicherweise bleiben die an die Umgebung abgegebenen AlkP<sub>asen</sub> in diesen Schleimhüllen stecken und gelangen somit nicht ins Umgebungswasser. Ein weiterer möglicher Grund könnte ein methodisches Problem bei der Filtrierung sein. Durch die Schleimhüllen verstopften die CA-Filter schnell und die Filtration von Zingster-Strom Wasserproben erfolgte sehr langsam. Extrazelluläre Substanzen könnten dabei im Schleim, der die Filterporen verschließt, hängen bleiben. Beide Möglichkeiten würden den geringen Anteil der gelösten AlkPA an der Gesamt-AlkPA im Zingster Strom erklären.

Im Zingster Strom sind die Chlorophyceen, nach den Cyanobakterien, die abundanteste Phytoplanktongruppe. Sie gehören in die Größenfraktionen  $> 5 \mu\text{m}$ , welche nur einen kleinen Anteil zu der Gesamt-AlkPA beitrugen (Abb. 3.1 c). Es erscheint rätselhaft, warum Chlorophyceen, die ein wesentlich geringeres Oberfläche:Volumen-Verhältnis aufweisen, weniger von einer P-Limitation betroffen sein sollten als Picocyanobakterien (Smith und Kalff 1982; Suttle et al. 1991; Lomas et al. 2014). Picocyanobakterien der Gattung *Synechococcus* und *Prochlorococcus* weisen selbst unter gesättigten Nährstoff Bedingungen ein höheres C:P- und N:P-Verhältnis auf als das Redfield Verhältnis. Damit haben diese Picocyanobakterien einen allgemein geringeren P-Bedarf und einen Konkurrenzvorteil vor heterotrophen Bakterien und großen Phytoplanktern (Moore et al. 2005). Müller (2012) beobachtete im Zingster Strom vom September bis November 2011 eine ähnliche Verteilung der partikulären AlkPA wie in dieser Dissertation, mit der  $0,7 - 1 \mu\text{m}$  Fraktion als dominierende Größenfraktion. Nur im September 2011 dominierten die  $1 - 20 \mu\text{m}$  und die  $> 20 \mu\text{m}$  Fraktionen die partikuläre AlkPA (Müller 2012). Warum die Größenfraktionen, in welche die Chlorophyceen fallen, meist geringere Anteile an der partikulären AlkPA aufweisen als die Größenfraktion der Picocyanobakterien könnte durch eine AlkPA-Markierung mit dem Substrat ELF®97-P gelöst werden. Das wasserlösliche Substrat ELF®97-P ermöglicht die Markierung der AlkPA von einzelnen Planktonzellen, da es nach der Hydrolyse am Ort der Entstehung ausfällt (González-Gil et al. 1998; Dyhrman und Palenik 1999; Nedoma et al. 2003). Durch den hydrophilen Charakter von ELF®97-P werden nur AlkP<sub>asen</sub> markiert, die an der äußeren Zellwand oder Membran lokalisiert sind (Nedoma et al. 2003). Schleimhüllen sollten für das hydrophile Substrat keine Barriere darstellen. Eine AlkPA-Markierung könnte Aufschluss darüber geben, warum der Anteil der Größenfraktion  $> 5 \mu\text{m}$ , welcher die Chlorophyceen und die koloniebildenden Cyanobakterien beinhaltet, so gering ausfiel.

Die AlkPA und PepA der Größenfraktion  $0,2 - 1 \mu\text{m}$  stammt von heterotrophen Bakterien und Picocyanobakterien. Bakterien können jedoch auch zur AlkPA und PepA der höheren

Größenfraktionen beitragen, da diese auch an Partikeln anheften und durch den Filtrationsvorgang die Sestonpartikel und Bakterien nicht voneinander getrennt werden können (Chróst et al. 1989). Die PepA wird hauptsächlich von Bakterien produziert und wird daher in der Größenfraktion 0,2 – 1 µm gemessen (Chróst et al. 1989). Dies steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis dieser Dissertation (Abb. 3.2). Die PepA der Größenfraktionen > 1µm stammen vermutlich ebenfalls von Bakterien, die an Partikeln anheften. Geringe Anteile der gelösten PepA an der Gesamt-PepA wurden auch in anderen Studien mit  $\text{Pep}_{\text{asen}}$ , Glucosidasen und Galactosidasen beschrieben (Chróst et al. 1989). Chróst et al. (1989) zogen die Möglichkeit in Betracht, dass diese geringen Aktivitäten im Umgebungswasser auf einer Verletzung der Zellen während des Filtrationsprozesses zurückzuführen sind, wodurch partikuläre Enzyme freigesetzt werden.

## 4.2 Die Eignung der gelösten alkalinen Phosphataseaktivität als Indikator einer Phosphorlimitation

Die Eignung der gelösten AlkPA als P-Limitationsindikator wird durch den Umstand beeinträchtigt, dass die gelösten  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  nicht nur von Bakterien und Phytoplanktern aufgrund von P-Stress freigesetzt werden (Luo et al. 2009; Xu et al. 2010; Dyhrman et al. 2012; Lin et al. 2013), sondern auch durch andere Mechanismen und Organismen. Zum einen können intrazelluläre  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  von Algenzellen durch Verletzungen nach Fraß von Zooplanktern freisetzen werden (Bochdansky et al. 1995; Møller 2007). Die virale Lyse oder Autolyse von Planktonorganismen nach dem Zelltod führt ebenfalls zu einem Freisetzen von intrazellulären  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  (Reichardt et al. 1967; Jansson et al. 1988). Durch Fäkalpellets von heterotrophen Organismen gelangen Phosphatasen, die an der Verdauung beteiligt sind, ins umgebende Wasser (Jansson 1976; Nagata und Kirchman 1992; Böök und Saborowski 2020). Boavida und Heath (1984) wiesen nach, dass *Daphnia magna* signifikante Mengen einer  $\text{AlkP}_{\text{ase}}$  und einer  $\text{AcidP}_{\text{ase}}$  ins Umgebungswasser freisetzen, welche sich nachweislich von den intrazellulären und membran gebundenen Alk- und  $\text{AcidP}_{\text{asen}}$  der als Nahrung verwendeten Alge *Chlamydomonas acidophila* unterschieden. Böök und Saborowski (2020) zeigten, dass die Phosphatasen in den Fäkalpellets der marinen Invertebraten *Idotea balthica*, *Palaemon varians* und *Homarus gammarus* mit den Phosphatasen in deren Verdauungstrakte übereinstimmen. Jansson (1976) beschrieb im Hymenjauresee (Nordschweden) signifikante Mengen gelöster  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  von Zooplanktern, wie *Bosmina obtusirostris*, *Holopedium gibberum* und *Cyclops scutifer*, die einen ähnlich hohen Anteil ausmachten wie die gelösten  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  der Phytoplankter. Neben Zooplanktern geben

auch heterotrophe Nanoflagellaten Phosphatasen in ihre Umgebung ab. Nagata und Kirchman (1992) beobachteten bei dem heterotrophe Nanoflagellaten *Paraphysomonas imperforata* die Abgabe einer  $\text{AcidP}_{\text{ase}}$  zusammen mit anderen Makromolekülen in die Umgebung. Cao et al. (2009) beschrieben in sieben unterschiedlich eutrophen Flachwasserseen (China) eine häufige AlkPA-Markierung von heterotrophe Nanoflagellaten mit ELF®97. In Gewässern besteht damit das  $\text{AlkP}_{\text{ase}}$ -Reservoir aus Enzymen unterschiedlicher Herkunft, die teilweise nicht aufgrund eines P-Stresses produziert wurden.

Neben der heterogenen Herkunft ist auch die Langlebigkeit der gelösten  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  ein Problem für deren Verwendung als P-Limitationsindikator. Berman (1970) beobachtete im See Geneza-reth (Israel) eine Aktivitätsabnahme der gelösten  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  von lediglich 20% nach zehn Tagen. Reichardt et al. (1967) beschrieben im Plußsee eine Abnahme der gelösten AlkPA von 50% nach drei Tagen. Jansson et al. (1981) zeigten, dass im Gårdsjönsee (Schweden) die gelösten  $\text{AcidP}_{\text{asen}}$  ihre Aktivität für 20 Tage beibehielten und selbst nach 69 Tagen noch 10% ihrer ursprünglichen Aktivität aufwiesen. Olsson (1983) ermittelte im Gårdsjönsee für  $\text{AcidP}_{\text{asen}}$  eine Halbwertszeit von 40 Tagen unter sterilen Bedingungen und von 14 Tagen unter in-situ Bedingungen. Im Golf von Akaba, einer Bucht im Norden des Roten Meeres, nahm die gelöste AlkPA mit 42 bis 74% einen sehr hohen Anteil an der Gesamt-AlkPA ein (Li et al. 1998). Untersuchungen zur Beständigkeit der gelösten AlkPA zeigten, dass die gelöste  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  bei 4°C und Dunkelheit ihre ursprüngliche Aktivität bis zu 40 Tage beibehielt. Erst nach weiteren zehn Tagen sank die gelöste AlkPA um 75%. Bei 24°C und einer Strahlungsintensität von 40  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (in-situ-Bedingungen) blieb die gelöste AlkPA dagegen nur für zwei Tage stabil. Danach sank sie kontinuierlich über die Zeit ab und hatte nach acht Tagen noch 50% und nach 30 bis 40 Tagen noch 25 bis 30% ihrer ursprünglichen Aktivität (Li et al. 1998). Selbst die  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  in den Fäkalpellets der marinen Invertebraten *Idotea balthica*, *Palaemon varians* und *Homarus gammarus* zeigten eine Halbwertszeit von zwei bis vier Tagen (Böök und Saborowski 2020). Diese Studien beweisen, dass gelöste  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  für mehrere Tage bis Wochen einen hohen Anteil ihrer Aktivität beibehalten können. Damit spiegelt die gelöste AlkPA nicht unbedingt einen aktuell vorherrschenden P-Stress in einem Gewässer wider (Beardall et al. 2001). Li et al. (1998) schlussfolgerten aus ihren Untersuchungen im Golf von Akaba, dass man die gelöste AlkPA auf zweierlei Weise deuten kann. Eine hohe gelöste AlkPA, zusammen mit einer hohen partikulären AlkPA, lassen auf eine langanhaltende P-Limitation schließen. Eine hohe gelöste AlkPA, zusammen mit einer niedrigen oder fehlenden partikulären AlkPA, deuten auf ein kürzlich stattgefundenes Ende einer P-Limitation hin (Li et al. 1998). Sowohl die gelöste als auch die partikuläre AlkPA konnten in dieser Studie ziemlich eindeutig den Picoplanktern

*Synechococcus* zugeordnet werden (Li et al. 1998). In Gewässern, in denen die gelöste AlkPA von mehreren unidentifizierten Quellen stammt, ist die oben genannte Interpretation der gelösten AlkPA vermutlich eher nicht anwendbar.

Aufgrund der oben genannten Gründe ist von der Nutzung der gelösten AlkPA als Indikator für eine P-Limitation abzuraten (Jansson et al. 1988; Hoppe 2003). Da der Anteil der gelösten AlkPA bis zu 90% an der Gesamt-AlkPA ausmachen kann (Healey und Hendzel 1979a; Chrost et al. 1984; Jansson et al. 1988), sollte die gelösten AlkPA immer mit gemessen und von der Gesamt-AlkPA abgezogen werden.

#### 4.3 Die Eignung der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität als Indikator einer Phosphorlimitation

Um die Eignung der partikulären AlkPA als einen Indikator für eine P-Limitation in Phytoplanktongemeinschaften zu beurteilen, wurden mehrere Aspekte betrachtet. Als Erstes die Normierung der AlkPA. Für die Verwendung der AlkPA als P-Limitationsindikator ist es notwendig, die Enzymaktivität auf die Biomasse zu beziehen, welche für die Produktion der AlkP<sub>asen</sub> verantwortlich ist. Ansonsten sind Vergleiche zwischen verschiedenen Probenahmezeitpunkten oder Gewässern nicht möglich. Wenn z. B. die hohe AlkPA im Zingster Strom durch einen Biomasseparameter normiert wird, liegt sie im Bereich von anderen P-limitierten Gewässern. Oligotrophe marine Gebiete wie im Mittelmeer (Caruso 2010) oder im subtropischen Atlantik (Vidal et al. 2003), in denen eine extreme P-Limitation vorherrscht, übertreffen dann den Zingster Strom um mehr als das zehnfache (Tabelle 4.2). Unnormiert wäre deren AlkPA niedriger als die des Zingster Stroms. Zum Zweiten sollte man die Grenzwerte betrachten, mit deren Hilfe die Werte der AlkPA als ein Grundrauschen, eine mittlere P-Limitation oder eine starke P-Limitation eingeordnet werden können. Die Eignung dieser Grenzwerte für unterschiedliche Gewässer ist entscheidend für die Interpretation der AlkPA. Zum Dritten wird die AlkPA mit anderen P-Limitationsindikatoren verglichen und die Reaktion der AlkPA auf eine Phosphatzugabe diskutiert. Daran soll gezeigt werden, wie sensitiv die AlkPA auf Veränderungen des P-Haushaltes in Phytoplanktongemeinschaften reagiert und wie gut diese damit geeignet ist, kurzfristige Änderungen von P-Limitations-Ereignissen zu benennen. Zum Schluss wird auf die zeitliche und räumliche Heterogenität der AlkPA eingegangen.



Tabelle 4.2: Der Vergleich der alkalinen Phosphataseaktivität zwischen verschiedenen Gewässern, unterteilt nach ihrem Trophiestatus

Gewässer Besonderheiten	Messbedingungen: Substrat, Temperatur, pH	AlkPA (nmol l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	AlkPA/Chl <i>a</i> (nmol µg <sup>-1</sup> Chl <i>a</i> h <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (µmol l <sup>-1</sup> )	DIP (µmol l <sup>-1</sup> )	Chl <i>a</i> (µg l <sup>-1</sup> )	Quelle
<b>Oligo-mesotroph</b>							
Mittelmeer – Adria & Straße von Messina; P-Limitation	0,1 – 20µM MUF-P in-situ Temp. und pH	0,001 – 1994	48 – 1621	4 – 125		0,01 – 1,8	Caruso 2010
Rotes Meer, Golf von Akaba P-Limitation	10 mM <i>p</i> -NPP 37°C; pH 8,5	20 – 235	15 – 1700		0,010 – 0,014	0,05 – 0,25	Li et al. 1998
Subtropischer Nord- bis Südatlantik P-Limitation	10µM MF-P 35°C; in-situ pH	4 – 50	44 – 1800		0 – 0,46	0,01 – 0,42	Vidal et al. 2003
Florida Bucht, Golf von Mexiko Flaches Ästuar; P-Limitation	0,05 – 2 µM MUF-P in-situ 20 – 31°C in-situ pH 8,0 – 8,5	137 – 1220	70 – 2993	0,35 – 20,5	0,04 – 0,37	0,12 – 14,8	Koch et al. 2009
Golf von Biskaya, Flussfahne des Gironde Ästuars, Spätwinter (mittlere P-Limitation) Spätfrühling (starke P-Limitation)	0,5 – 250µM MUF-P in-situ Temp. (10 – 17°C) in-situ pH	2 – 8 5 – 400	1 – 3 40 – 150	4,41 – 9,72 0,43 – 6,06	0,12 – 0,33 0,001 – 0,008	0,56 – 1,53 0,41 – 2,41	Labry et al. 2005
Nordwest-Atlantik, zwischen Afrika und den Kanaren Auftriebsgebiet, eutroph Offshore oligotroph	0 – 25µM MUF-P in-situ Temp. in-situ pH	0,29 – 0,36 0,07 – 0,08	0,04 – 0,05 0,15 – 0,5		0,04 – 0,16 0,04 – 0,04	6,6 – 7,3 0,15 – 0,5	Sebastián et al. 2004
Subtropischer Nordpazifikwirbel N-Limitation	2 µM DiFMUF-P in-situ Temp. und pH	0,36 – 1,28	3 – 18		0,013 – 0,059	0,06 – 0,12	Duhamel et al. 2010

Tabelle 4.2: Fortsetzung

Gewässer Besonderheiten	Messbedingungen: Substrat, Temperatur, pH	AlkPA (nmol l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	AlkPA/Chl <i>a</i> (nmol µg <sup>-1</sup> Chl <i>a</i> h <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (µmol l <sup>-1</sup> )	DIP (µmol l <sup>-1</sup> )	Chl <i>a</i> (µg l <sup>-1</sup> )	Quelle
<b>Meso-Eutroph</b>							
Heiligendamm Ostseeküste, Deutschland	1 – 250 µM MUF-P 21°C; pH 8,2	16 – 69	6 – 99	3,5 – 60	0 – 1,7	0,5 – 5	Eigene Daten
Pommersche Bucht, Ostseeküste	250 µM MUF-P in-situ Temp. und pH	0,1 – 550	0,4 – 65,5		0 – 2,7	0,5 – 97	Nausch 1998
Kieler Förde, Deutschland, Frühling	0,5 – 40µM MUF-P						Hoppe 1983
Innere der Förde	In-situ Temp.	24 – 16,8	1,9 – 3,0			8 – 8,9	
Mündung in Ostsee	pH 10	0,08 – 0,1	0,04			2,4 – 2,5	
Erkensee, Schweden	100 µM MUF-P						Rengefors et al. 2001
Frühjahrsblüte Mrz.	20°C; pH 8,3	30	1,2		0,13	31	
Nach Blütenzusammenbruch Apr.		24 – 29	11 – 12		0	2 – 3	
Mai		1,2 – 3,6	0,6 – 2,1		0 – 0,03	1 – 3	
<b>Eu-hypertroph</b>							
Oberwarnow, Tieflandfluss	1 – 250 µM MUF-P	78 – 1045	2 – 21	1,0 – 28,3	0 – 1,2	11 – 94	Eigene Daten
Zingster Strom, Lagune	21°C; pH 8,2	1070 – 9194	14 – 109	1,8 – 14,6	0 – 0,5	28 – 137	
Plußsee, Deutschland	10 – 500 µM MUF-P	10 – 49	0,3 – 9,8	19 – 31	2,6 – 4,6	5 – 65	Chróst et al. 1989
Mrz. – Apr.	in-situ 4 – 18°C in-situ pH						
Schlei Förde, Deutschland, Frühling	0,5 – 40µM MUF-P						Hoppe 1983
Innere der Förde	in-situ Temp.; pH 10	198 – 394	3,2 – 3,7			53 – 109	
Mündung in die Ostsee		0,04 – 0,13	0,009 – 0,07			1,9 – 4,1	

AlkPA = alkaline Phosphataseaktivität; Chl *a* = Chlorophyll *a*; DIP = gelöster anorganischer Phosphor; K<sub>M</sub> = Michaeliskonstante; Substrat für AlkPA-Messung: DiFMUF-P = 6,8-Difluoro-4-Methylumbelliferyl-Phosphate; MUF-P = 4-Methylumbelliferyl-Phosphat, MF-P = *o*-Methylfluorescein-Phosphat, *p*-NPP = *p*-Nitrophenolphosphat

#### 4.3.1 Die Wahl des Normierungsparameters und dessen Einfluss auf die Interpretation der alkalinen Phosphataseaktivität

Um die partikuläre AlkPA nicht falsch zu interpretieren ist die Wahl des richtigen Normierungsparameters von essenzieller Bedeutung. Dafür muss ein Biomasseparameter gewählt werden, welcher die AlkPA-produzierenden Mikroorganismen am besten beschreibt (Cao et al. 2010). Die Normierung der partikulären AlkPA wird durch den Umstand erschwert, dass diese nicht nur von P-limitierten Phytoplanktern synthetisiert werden, sondern auch von P- oder C-limitierten Bakterien (Healey 1973; Nicholson et al. 2006). Aus einer positiven Korrelation zwischen einer Enzymaktivität und einem Biomasseparameter, wie dem Chl *a*-Gehalt oder der Bakterienabundanz, wird oft die vermeintliche Herkunft der Enzymaktivität hergeleitet. Solche Korrelationen sind jedoch nur ein indirekter Indikator für die Enzym-produzierende Organismengruppe und kein direkter Nachweis (Jansson et al. 1988). Nicholson et al. (2006) fanden z. B. in der Bucht von San Francisco eine signifikant positive Korrelation zwischen der AlkPA und dem Chl *a*-Gehalt. Markierungen der AlkPA mit ELF®97 zeigten jedoch, dass Bakterien die alleinigen Produzenten der AlkPA waren. Fehlende Korrelationen zwischen einer hydrolytischen Enzymaktivität und einem Biomasseparameter, der die vermutete Enzymproduzierende Organismengruppe widerspiegelt, sind nicht weiter verwunderlich (Chróst und Overbeck 1987; Senjarini et al. 2008). Schließlich ist die Produktion von hydrolytischen Enzymen von anderen Faktoren, wie Nährstoffmangel und Substratverfügbarkeit, abhängig (Chróst und Overbeck 1987). So zeigten die partikuläre AlkPA und PepA der Ostsee keine Korrelationen mit der Bakterienabundanz, obwohl die Größenfraktionierungen im Winter und Frühling dafürsprachen, dass beide Enzymaktivitäten zum Großteil von der Bakterienfraktion stammten (Tabelle A5 und A6, Abb. 3.1 und 3.2). Die partikuläre AlkPA der Ostsee war damit nicht von der Bakterienbiomasse, sondern von dem Phosphatangebot abhängig, wie ein inverses Verhältnis zwischen der partikulären AlkPA und dem DIP-Gehalt zeigte (Tabelle A7). Fehlende Korrelationen zwischen der partikulären AlkPA und dem DOP-Gehalt in allen drei Gewässern (Tabelle A7, A8, und A9) könnten darauf zurückzuführen sein, dass nicht der gesamte DOP-Gehalt enzymatisch abbaubar ist und aus Phosphomonoestern besteht (Francko 1984; Chróst und Overbeck 1987).

Eine direktere Methode, die Herkunft der partikulären AlkPA zu ermitteln als die Korrelationsanalyse, ist die größenfraktionierte AlkPA-Messung. Sie ermöglicht eine grobe Trennung der Bakterien- und Phytoplanktonbasierten AlkPA. Picophytoplankter fallen jedoch in die Größenfraktion der Bakterien und Partikel-assoziierte Bakterien fallen in die Größenfraktion der Phytoplankter. In Gewässern, in denen Picophytoplankter und Partikel-assoziierte Bakterien

keine großen Abundanzen einnehmen, ist eine größenfraktionierte AlkPA-Messung gut geeignet, um zwischen einer Bakterien- und Phytoplanktonbasierten AlkPA zu unterscheiden. Labry et al. (2005) teilten die AlkPA der Planktongemeinschaft im Golf von Biskaya mithilfe der Größenfraktionierung in eine gelöste Fraktion ( $< 0,2\mu\text{m}$ ) sowie in eine Phytoplankter- ( $> 1\mu\text{m}$ ) und Bakterienfraktion ( $0,2 - 1\mu\text{m}$ ) ein. Um eine Beteiligung von Picophytoplanktern ( $0,4 - 3\mu\text{m}$ ) an der Bakterienfraktion weitestgehend auszuschließen, wurde der Chl *a*-Gehalt in der Bakterienfraktion gemessen. Ein geringer Anteil des Chl *a*-Gehalts der  $< 1\mu\text{m}$  Fraktion an dem Gesamt-Chl *a*-Gehalt, zusammen mit einer geringen Cyanobakterienbiomasse und einem geringen Level von Zeaxanthin, einem Biomarkerpigment für Mikroalgen und Cyanobakterien, bestätigte die geringe Beteiligung von Picophytoplanktern an der Bakterienfraktion (Labry et al. 2005). Um eine hohe Beteiligung von Bakterien, die an Partikeln gebunden sind, von der Phytoplanktonfraktion auszuschließen, wurde die Abundanz von freien und Partikel-assoziierten Bakterien getrennt gezählt. Niedrige Anteile von Partikel-assoziierten Bakterien an der Gesamtbakterienabundanz schloss eine hohe Beteiligung von Bakterien an der  $> 1\mu\text{m}$  Fraktion aus (Artigas 1998; Labry et al. 2005). Labry et al. (2005) verglichen zusätzlich das Verhältnis  $\text{AlkPA} > 1\mu\text{m} : \text{AlkPA } 0,2 - 1\mu\text{m}$  mit dem Verhältnis  $C_{\text{phytoplankter}} : C_{\text{Bakterien}}$ . Eine hohe, signifikant positive Korrelation dieser beiden Verhältnisse zueinander sprach dafür, dass die  $\text{AlkPA} > 1\mu\text{m}$  bzw. die  $\text{AlkPA } 0,2 - 1\mu\text{m}$  die Gesamtheit der Phytoplankter bzw. der Bakterien über den gesamten Probenahmezeitraum repräsentierten (Labry et al. 2005). Um die Trennung der Bakterien- und Phytoplanktonbasierten AlkPA zu bestätigen, bestimmten Chróst und Overbeck (1987) neben dem Chl *a*-Gehalt die Primärproduktion, den  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau und die heterotrophe  $^{14}\text{C}$ -Glucoseaufnahme in der Bakterien- und Phytoplanktonfraktion. Ein geringer  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau und eine geringe heterotrophe  $^{14}\text{C}$ -Glucoseaufnahme in der  $> 3\mu\text{m}$  Fraktion bestätigte geringe Anteile von Partikel-assoziierten Bakterien in der Phytoplanktonfraktion und ein geringer Chl *a*-Gehalt und eine geringe Primärproduktion in der  $0,2 - 3\mu\text{m}$  Fraktion bestätigte geringe Anteile von Phytoplankter in der Bakterienfraktion (Chróst und Overbeck 1987). Ein hoher Anteil von Partikel-assoziierten Bakterien an der Gesamtbakterienabundanz kann zu einer hohen Beteiligung von Bakterien an der Phytoplanktonfraktion der AlkPA zur Folge haben. Bakterien, die an Partikel gebunden sind, zeigen meist höhere hydrolytische Enzymaktivitäten als Bakterien in der freien Wassersäule (Karner und Herndl 1992; Grossart und Simon 1998). Labry et al. (2016) beobachteten in zwei Ästuaren an der Nordwestküste Frankreichs hohe AlkPA, die hauptsächlich auf Partikel-assoziierte Bakterien zurückzuführen waren. Ein niedriger Anteil der Bakterienfraktion ( $0,2 - 1\mu\text{m}$ ) an der Gesamt-AlkPA, dafür eine hohe Beteiligung der Algenfraktion ( $> 1\mu\text{m}$ ) an der Gesamt-AlkPA,

eine starke Korrelation zwischen der partikulären AlkPA und der Bakterienbiomasse und ein enger Zusammenhang zwischen der Produktion der Partikel-assoziierten Bakterien und der AlkPA, führte zu dieser Schlussfolgerung. Cao et al. (2010) beschrieben in dem hypertrophen See Yuehu (Zentralchina) längliche Partikel, die in die Phytoplanktonfraktion ( $> 3 \mu\text{m}$ ) fielen, keine Chlorophyll-Autofluoreszenz aufwiesen, jedoch eine ELF®97-markierte AlkPA zeigten. Cao et al. (2010) vermuteten, dass Bakterien oder heterotrophe Nanoflagellaten, die an Partikeln anhafteten, für die AlkPA verantwortlich waren. Stewart und Wetzel (1982) zeigten in vier verschiedenen Seen in Michigan (USA), dass 15 bis 73% der Gesamt-AlkPA in Beziehung zu nicht Phytoplankton-assoziierten Partikeln standen. Die größenfraktionierte AlkPA-Messung kann daher zu einer starken Überbestimmung der Phytoplanktonbasierten AlkPA führen, wenn mit den oben erwähnten Methoden die Beteiligung von Partikel-assoziierten Bakterien an der Phytoplanktonfraktion nicht ausgeschlossen wird (Stewart und Wetzel 1982; Nicholson et al. 2006).

Um die Produzenten der partikulären AlkPA direkt zu ermitteln, ist die Markierung der AlkPA an den verursachenden Zellen mittels ELF®97 geeignet. Dafür wird das wasserlösliche Substrat ELF®97-P genutzt, dessen Produkt, das ELF®97, nach der Hydrolyse ausfällt und damit den Ort der Enzymreaktion durch ein Fluoreszenzsignal anzeigt (Rengefors et al. 2001; Van Wambeke et al. 2008; Cao et al. 2010). Rengefors et al. (2001) beschrieben im Erkensee (Schweden) Übereinstimmungen und keine Übereinstimmungen zwischen der AlkPA/Chl *a* der gesamten Gemeinschaft, gemessen mit MUF-P als Substrat, und der ELF®97-markierten AlkPA auf Artniveau. Zum Beispiel zeigte die AlkPA/Chl *a* während der Frühjahrsblüte keine P-Limitation an, und auch die zu diesem Zeitpunkt dominanten Diatomeenarten waren nicht mit ELF®97 markiert. Nach dem Zusammenbruch der Frühjahrsblüte stieg die AlkPA/Chl *a* zu einem Höhepunkt an (Tabelle 4.2), jedoch wiesen die dominanten Phytoplanktonarten keine ELF®97-Markierungen auf. Es wurde vermutet, dass Bakterien oder Zooplankter die Verursacher dieses AlkPA-Maximums waren (Rengefors et al. 2001). Mit der ELF®97-markierten AlkPA lassen sich auch innerhalb einer Population unterschiedliche Nährstoffmangelsituationen feststellen, welche auf dem individuellen Mikroumfeld und dem individuellen internen P-Status beruhen (Rengefors et al. 2001; Štrojsová et al. 2003; Schumann et al. 2009). Eine AlkPA, die nur von einem Teil der Phytoplanktongemeinschaft produziert, aber durch einen Biomasseparameter normiert wird, der die gesamte Phytoplanktongemeinschaft widerspiegelt, führt zwangsläufig zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse. Im Erkensee wurden von Mai bis Juni die häufigsten ELF®97-Markierungen festgestellt (Rengefors et al. 2001). Die AlkPA/Chl *a* blieb jedoch auf einem niedrigen Niveau (Tabelle 4.2). Dies wurde dadurch

erklärt, dass die ELF®97-markierten Phytoplanktonarten maximal 20% der gesamten Phytoplanktonbiomasse ausmachten. Die Biomasse-dominierenden Phytoplanktonarten zeigten selten oder nie eine ELF®97-markierte AlkPA (Rengefors et al. 2001). In der Bucht von Monterey (USA) dominierten Diatomeen mit 82% die Phytoplanktongemeinschaft. Die gesamte ELF®97-markierte AlkPA wurde jedoch fast ausschließlich (> 90%) von den weniger abundanten Dinoflagellaten (18% der Phytoplanktongemeinschaft) angezeigt (Nicholson et al. 2006). Diese Studien zeigen deutlich, dass ein allgemeiner Algenbiomasseparameter nicht geeignet ist, um die AlkPA auf die AlkP<sub>ase</sub>-produzierende Gemeinschaft zu normieren, wenn nur ein Teil der Phytoplanktongemeinschaft zur AlkPA beiträgt (Cao et al. 2010). Wenn zusätzlich Bakterien am AlkP<sub>ase</sub>-Reservoir mitwirken, verfälscht sich das Ergebnis weiter. Dies erklärt auch die Unterschiede in der AlkPA in den drei in dieser Dissertation untersuchten Gewässern mit der Wahl des Normierungsparameters (Abb. 3.10). Jeder Normierungsparameter, wie der Chl *a*-Gehalt, POM-Gehalt oder partikuläre PepA, beschreibt eine andere mikrobielle Biomasse. Der Chl *a*-Gehalt charakterisiert alle phototrophen Bakterien und Phytoplankter. Der POM-Gehalt beinhaltet neben Phototrophen, heterotrophe Bakterien und Partikel assoziierte Bakterien auch abgestorbene organische Partikel. Die partikuläre PepA wird zum Großteil von Bakterien produziert. Als Normierungsparameter scheint sie daher vor allem in Gewässern wie dem Zingster Strom sinnvoll zu sein, in denen die AlkP<sub>asen</sub> hauptsächlich von Bakterien und Cyanobakterien produziert werden.

Die Wahl eines geeigneten Normierungsparameters für die partikuläre AlkPA setzt ein gutes Wissen voraus über die Phytoplanktonzusammensetzung, die Partikel-assoziierten und freien Bakterienabundanzen und deren jeweiligen Anteile an der Produktion der partikulären AlkP<sub>asen</sub>. Da sich dominierende, nicht P-limitierte Phytoplanktonarten von den seltenen, P-limitierten Phytoplanktonarten nicht mit einer Größenfraktionierung trennen lassen, ist die ELF®97-markierte AlkPA-Messung die geeignetste Methode, um eine P-Limitation im Phytoplankton nachzuweisen. Die Problematik der Normierung entfällt bei dieser Methode komplett.

#### 4.3.2 Die Nutzung von Grenzwerten zur Interpretation der alkalinen Phosphataseaktivität

Healey und Hendzel (1979a) waren eine der Ersten, die mithilfe P-limitierter und ausreichend P-versorgter Algenkulturen Grenzwerte für die AlkPA definierten, um damit die AlkPA-Werte zu interpretieren. Ihre Ergebnisse machten deutlich, dass es auch Phytoplanktonarten gibt, die

unter P-Mangel keine erhöhte AlkPA aufweisen. Zu diesen Arten zählen z.B. *Ochromonas vallesiaca*, *Pseudanabaena catenata* und *Cryptomonas erosa* (Healey und Hendzel 1979b; Healey und Hendzel 1979a). *Cryptomonas erosa* reagiert auf eine P- und auch N-Limitation vielmehr mit Cystenbildung und einer Senkung der metabolischen Aktivität (Healey und Hendzel 1979b). Hinzu kommt, dass einige Algenarten wie *Aulacoseira granulata* sehr wohl im Zuge eines P-Mangels ihre AlkPA erhöhen, diese aber im Verhältnis zur AlkPA anderer Algenarten sehr gering ist und damit unterhalb der ermittelten Grenzwerte liegt (Healey und Hendzel 1979a). Healey und Hendzel (1979a) erhielten daher Grenzwerte, unterhalb derer die AlkPA nicht eindeutig eine P-Limitation ausschließt. Dies erklärt auch die geringen partikulären AlkPA in den drei untersuchten Gewässern bei Phosphatkonzentrationen nahe der Bestimmungsgrenze (Abb. 3.11 a) und unter P-limitierten Bedingungen im Seston (Abb. 3.11 b und c). Und auch die inversen hyperbolischen Verhältnisse beschrieben von Siuda und Chrost (1987; AlkPA versus Phosphat), Gage und Gorham (1985; AlkPA/POM versus PP/POM), Labry et al. (2005; AlkPA, AlkPA/C<sub>Phytoplankton</sub> und AlkPA/C<sub>Bakterien</sub> versus Phosphat) und Mahaffey et al. (2014; AlkPA/Chl *a* versus Phosphat) zeigten unter niedrigen Phosphatkonzentrationen bzw. zellinternen P-Gehalten, neben hohe auch niedrige AlkPA. So kann es durchaus vorkommen, dass eine Phytoplanktongemeinschaft gemäß der AlkPA als nicht P-limitiert eingestuft wird, obwohl sie es ist (Falsch negativ). AlkPA die trotz niedriger Phosphatkonzentrationen im Bereich des Grundrauschens liegen, können auch dadurch verursacht werden, dass hohe intrazelluläre P-Speicherkapazitäten der AlkP<sub>ase</sub>-Produktion entgegenwirken (Chróst und Overbeck 1987). Dies ist jedoch kein falsches Ergebnis, da Phytoplankter mit hohen P-Speicherkapazitäten noch nicht P-limitiert sind. Diese Möglichkeit erklärt zumindest geringe AlkPA bei niedrigen Phosphatkonzentrationen, aber nicht geringe AlkPA bei niedrigen PP:POM- oder hohen PN:PP-Verhältnissen.

Die konstitutive Enzymaktivität ist zwischen verschiedenen Algenarten unterschiedlich hoch. Fitzgerald und Nelson (1966) beschrieben eine große Bandbreite der konstitutiven AlkPA zwischen verschiedenen Süßwasseralgen. Die höchsten Werte zeigten dabei Cyanobakterien. So kann die Grenze zwischen konstitutiver und P-limitierter AlkPA ebenfalls mit der Artzusammensetzung der Gewässer und somit auch innerhalb eines Gewässers, mit der Jahreszeit und dem damit verbundenen Wechseln der dominanten Phytoplanktonarten, variieren. Die ermittelten Grenzwerte sind somit keine starren Grenzen, sondern Grenzen, die je nach Phytoplanktonzusammensetzung nach oben oder unten wandern können. Für jede Phytoplanktonzusammensetzung müssten die Grenzwerte damit neu ermittelt werden.

Doch nicht nur in der Unterscheidung zwischen den Status „keine P-Limitation“ und „P-Limitation“ zeigen die Grenzwerte Schwächen. Auch in der Unterscheidung zwischen den Status „mittlere P-Limitation“ und „starke P-Limitation“. Die von Healey und Hendzel (1979 a und c) ermittelten Grenzwerte für die AlkPA wurden für verschiedene Normierungsmöglichkeiten angegeben: POM-, Chl *a*-, PP- oder POC-Gehalt (Tabelle A1). Der Einsatz der verschiedenen Grenzwerte sollte innerhalb eines Gewässers zu der gleichen Bewertung der AlkPA führen. Dies war jedoch nicht der Fall. In den drei untersuchten Gewässern unterschied sich die Interpretation der AlkPA stark zwischen den verschiedenen normierten Grenzwerten (Tabelle 3.3). Damit hängt die Interpretation der AlkPA nicht nur davon ab, einen geeigneten Normierungsparameter zu finden, sondern auch davon, dass der Grenzwert mit diesem Normierungsparameter den Status der P-Limitation in dem jeweiligen Gewässer optimal beschreibt. Die Nutzung eines einheitlichen, z.B. Chl *a*-normierten, AlkPA-Grenzwertes für alle Gewässer kann zu Fehlinterpretationen führen. Da diese Grenzwerte lediglich anhand zweier Grünalgen (*Chlamydomonas reinhardtii* und *Scenedesmus quadricauda*), einem Cyanobakterium (*Anabaena variabilis*) und einer Cryptophyceae (*Cryptomonas erosa*) definiert wurden, sollte es jedoch nicht weiter verwundern, wenn diese nicht universell einsetzbar sind (Healey und Hendzel 1979b; Healey und Hendzel 1979a).

Gründe für eine abweichende Einschätzung der Chl *a*-normierten AlkPA im Vergleich zu der POM-normierten AlkPA kann auf unterschiedliche Chl *a*:POM-Verhältnisse zwischen den Gewässern beruhen. Das Lichtklima und die Artenzusammensetzung beeinflussen den Chl *a*-Gehalt pro Algenbiomasse. Picophytoplankter haben ein sehr viel höheres Chl *a*:Biomasse-Verhältnis als größere Phytoplankter (Schumann et al. 2009). Zudem sinkt der Chl *a*-Gehalt pro Algenbiomasse nicht nur aufgrund einer P-, sondern auch aufgrund einer N-Unterversorgung (Healey 1973). In der Ostsee wurde nur mit den Grenzwerten für die partikulären AlkPA/Chl *a* eine ganzjährige P-Limitation angezeigt, nicht jedoch mit den Grenzwerten der partikulären AlkPA/POM, AlkPA/PP oder AlkPA/POC (Tabelle 3.3). Im Zingster Strom wiesen die meisten P-Limitationsindikatoren auf eine starke P-Limitation. Die Werte für die partikuläre AlkPA/Chl *a* zeigten jedoch eine fünfmal höhere P-Limitation an als die partikuläre AlkPA/PP bzw. eine elfmal höhere P-Limitation als die partikuläre AlkPA/POM. Eine Phosphatzugabe zu natürlichen Zingster Strom-Proben führte zu einem Absinken der AlkPA/Chl *a*. Sie blieb jedoch selbst nach sieben Tagen über dem Grenzwert von Healey und Hendzel (1979a) für eine extreme P-Limitation (Daten nicht gezeigt). In der Warnow gaben die Grenzwerte für die partikuläre AlkPA, normiert über den Chl *a*-, POM- oder PP-Gehalt, dagegen sehr ähnliche Ergebnisse wieder (Tabelle 3.3). Diese unterschiedlichen



Übereinstimmungen der verschiedenen Grenzwerte zwischen den Gewässern könnte auf dem sehr viel höheren Chl *a*/POM-Verhältnis der Warnow als dem der Ostsee und des Zingster Stroms beruhen (Tabelle 3.1). Die Interpretation der AlkPA/Chl *a* im Golf von Biskaya von Labry et al. (2005) passte mit den Grenzwerten von Healey und Hendzel (1979a) ebenfalls nicht ganz überein. Im Spätwinter zeigte eine AlkPA/Chl *a* von 1 – 3 nmol µg<sup>-1</sup> Chl *a* h<sup>-1</sup> keinen P-Mangel an. Jedoch vermuteten Labry et al. (2005) aufgrund der geringen Phosphatkonzentration bereits im Spätwinter eine mittlere P-Limitation (Tabelle 4.2). Im Gegensatz dazu lag eine *Skeletonema costatum* Blüte im Trondheimfjord (Norwegen) mit den AlkPA/Chl *a*-Werten innerhalb der von Healey und Hendzel (1979a) ermittelten Grenzwerte (Myklestad und Sakshaug 1983). Zusammen mit anderen P-Limitationsanzeigern, wie dem N:P- und dem Glucan:P-Verhältnis im Seston, zeigte eine AlkPA/Chl *a* kleiner als 3 nmol µg<sup>-1</sup> Chl *a* h<sup>-1</sup> im Frühjahr keine P-Limitation bzw. eine AlkPA/Chl *a* von 3 – 6 nmol µg<sup>-1</sup> Chl *a* h<sup>-1</sup> im Sommer eine mittlere bis starke P-Limitation an (Myklestad und Sakshaug 1983). Nausch (1998) beobachtete in der Pommerschen Bucht der Ostsee bei einer Phosphatkonzentration von 0,2 µm l<sup>-1</sup> einen Übergang von einer hohen zu einer niedrigen AlkPA/Chl *a*. Diese Übergänge lagen genau an den Grenzwerten definiert von Healey und Hendzel (1979a). Die Grenzwerte der AlkPA/Chl *a* erscheinen somit für bestimmte Gewässer nutzbar, für andere jedoch viel zu niedrig angesetzt zu sein, um zwischen einer mittleren und starken P-Limitation zu unterscheiden. Dies zeigt auch, dass es keinen einheitlichen partikulären AlkPA/Chl *a*-Grenzwert geben kann, der für jedes Gewässer gleichermaßen zutrifft und optimal zwischen keiner, einer mittleren und einer starken P-Limitation unterscheiden lässt.

Die Grenzwerte für die AlkPA/POC sind sehr hoch angesetzt. Selbst im Zingster Strom, in dem die meisten P-Limitationsindikatoren eine starke P-Limitation anzeigten, lag die AlkPA um mehr als eine Größenordnung unter den AlkPA/POC-Grenzwerten für eine P-Limitation (Tabelle 3.3 und A1). Möglicherweise liegt hier ein Fehler bei der Berechnung des AlkPA/POC-Grenzwertes vor. Die partikuläre AlkPA normiert über den PP-Gehalt zeigte zwischen den drei untersuchten Gewässern die höchsten Korrelationen mit den N:P- und C:P-Verhältnissen im Seston und die besten inversen hyperbolischen Beziehungen zu dem DIP-Gehalt und dem PP:POM-Verhältnis (Abb. 3.11, Tabelle 3.4). Auch in der Bewertung des P-Status der drei Gewässer für die Jahreszeiten scheinen die Grenzwerte der AlkPA/PP noch am besten mit den anderen P-Limitationsindikatoren übereinzustimmen (Tabelle 3.3). Die AlkPA/PP ist ein Parameter, der in beide Richtungen wirkt. Bei steigender P-Limitation steigt einerseits die Synthese der AlkP<sub>asen</sub> und andererseits sinkt der zellinterne P-Gehalt (Myklestad und Sakshaug 1983; Gage und Gorham 1985; Chróst und Overbeck 1987). Dies führt zu einer

breiteren Trennung von nicht P-limitierten und P-limitierten Bedingungen. Da die partikuläre AlkPA/PP und die partikuläre AlkPA/POC selten zur Bewertung eines Gewässers genutzt wird, fehlen Vergleiche mit anderen Gewässern, um eine abschließende Empfehlung für diese Grenzwerte abzugeben. Vermutlich gilt für diese Grenzwerte aber das gleiche wie für die partikuläre AlkPA/Chl  $\alpha$ -Grenzwerte. Für manche Gewässer sind die beschriebenen Grenzwerte geeignet, die partikuläre AlkPA zu interpretieren, für andere wiederum nicht.

#### 4.3.3 Der Vergleich der alkalinen Phosphataseaktivität mit anderen P-Limitationsindikatoren

Um die Aussagen, die mit der AlkPA getroffen wurden abzusichern, werden oft weitere P-Limitationsindikatoren mit gemessen. Diese sind jedoch ebenfalls nicht einfach zu interpretieren. So wird häufig das C:N:P-Verhältnis im Seston herangezogen, um durch die zellinternen Elementverhältnisse eine Aussage über die Nährstoffbedingungen in der Umgebung zu treffen. Veränderte C:N:P-Verhältnisse im Seston im Zuge einer Nährstofflimitation beruhen auf einer, in den meisten Phytoplankter ähnliche, physiologischen Antwort. So reagieren viele Phytoplankter auf eine Nährstofflimitation mit einer Abnahme des zellulären Gehalts des limitierenden Nährstoffs, den Photosynthesepigmenten, Proteinen, DNA und RNA und einer Akkumulation von Kohlenhydrat-, Lipid-, oder Phosphorspeicherstoffen (Healey 1973; Perry 1976). Lichtverhältnisse und Temperaturbedingungen beeinflussen ebenfalls das C:N:P-Verhältnis in Algen und artspezifische Unterschiede können groß sein (Finkel et al. 2010). Healey und Hendzel (1980) nutzten ein N:P Verhältnis von 22, um zwischen P-limitierenden und P-gesättigten Kulturen zu unterscheiden. Cyanobakterien der Gattungen *Synechococcus* und *Prochlorococcus* zeigten jedoch selbst unter gesättigten Nährstoffbedingungen ein relativ hohes C:N:P Verhältnis (21:1 bis 33:1), welches unter einer P-Limitation weiter anstieg (59:1 bis 109:1) (Bertilsson et al. 2003; Heldal et al. 2003). Die C:P- und N:P-Verhältnisse in *Chryptomonas erosa* lagen unter nährstoffgesättigten Bedingungen ebenfalls höher als die Redfield-Verhältnisse und damit bereits in Bereichen, welche in anderen Phytoplanktonarten eine P-Limitation anzeigen würden (Healey und Hendzel 1979b). *Chaetoceros affinis* var. *willei* induzierte erst ab einem N:P-Verhältnis von 30 die Synthese von AlkP<sub>asen</sub> (Møller et al. 1975). Bei einem C:N:P-Verhältnis oberhalb des Redfield-Verhältnisses kann daher nicht automatisch von einer P-Limitation ausgegangen werden. Umgekehrt bedeutet ein C:N:P-Verhältnis unterhalb des Redfield-Verhältnisses nicht, dass alle Phytoplanktonzellen gut mit P versorgt sind. In der Bucht von Monterey (USA) waren die weniger abundanten Dinoflagellaten (18% der

Gesamtphytoplanktonabundanz) häufig P-limitiert (ELF®97-markierte AlkPA), obwohl das N:P-Verhältnis im Seston bei 12:1 lag und damit eigentlich eine gute P-Versorgung anzeigte (Nicholson et al. 2006). Für das C:N:P-Verhältnis trifft die gleiche Problematik zu, wie für die partikuläre AlkPA bereits beschrieben wurde. Die verschiedenen Arten und Organismengruppen einer Planktongemeinschaft sind oft ganz unterschiedlichen Nährstoffmangelsituationen ausgesetzt. Das C:N:P-Verhältnis im Seston entspricht jedoch einem Mittelwert der gesamten Planktongemeinschaft und ist damit nicht geeignet eine P-Limitationen zu beschreiben die nicht von der Gesamtheit, sondern nur von einem Teil der Planktongemeinschaft stammt.

Als weiterer Indikator für einen P-Mangel in der Planktongemeinschaft wird die extrazelluläre Phosphatkonzentration genutzt. Inverse Verhältnisse zwischen der AlkPA und dem DIP-Gehalt im Gewässer wurden mehrfach beschrieben (Healey und Hendzel 1980; Chrost et al. 1984; Siuda und Chrost 1987; Chróst und Overbeck 1987; Vrba et al. 1995; Nausch 1998; Vidal et al. 2003; Labry et al. 2005; Mahaffey et al. 2014). Ein solcher Zusammenhang beruht auf der direkten Kopplung der Phosphatkonzentration in der Umgebung und der P-Limitations-Induktionsantwort von Phytoplanktern. Die Produktion von  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  wird über die intra- und extrazelluläre Phosphatkonzentration reguliert (Karl 2014). Phosphat hemmt zudem die Aktivität der  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  kompetitiv, da Phosphat mit den Phosphorestern um die aktive Bindungsstelle im Enzym konkurriert und daran bindet (Jansson 1976; Chróst und Overbeck 1987; Jansson et al. 1988). Labry et al. (2005) beschrieb im Golf von Biskaya inverse hyperbolische Verhältnisse zwischen der unnormierten AlkPA, der  $\text{AlkPA}/C_{\text{Phytoplankter}}$  und der  $\text{AlkPA}/C_{\text{Bakterien}}$  mit der Phosphatkonzentration. Der Übergang zwischen einer hohen ( $> 10 \text{ nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) und niedrigen unnormierten AlkPA ( $< 10 \text{ nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) fand zwischen  $0,05$  und  $0,1 \text{ } \mu\text{mol Phosphat l}^{-1}$  statt (Labry et al. 2005). Siuda und Chrost (1987) beschrieben in zwölf verschiedenen Seen der Masurenischen Seenplatte (Polen) ebenfalls ein inverses hyperbolisches Verhältnis zwischen der unnormierten AlkPA und der Phosphatkonzentration. Die höchsten AlkPA ( $> 60 \text{ nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) wurden zwischen  $0$  und  $0,24 \text{ } \mu\text{mol Phosphat l}^{-1}$  und die niedrigsten AlkPA ( $< 30 \text{ nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) wurden ab  $1,6 \text{ } \mu\text{mol Phosphat l}^{-1}$  gemessen. Die in diesen beiden Studien beschriebenen unterschiedlichen Grenzen zwischen einer hohen und niedrigen unnormierten AlkPA machen wiederum deutlich, dass eine Normierung der AlkPA nötig ist, um verschiedene Gewässer vergleichen zu können. Nausch (1998) zeigte in der Pommerschen Bucht der Ostsee bei einer Phosphatkonzentration von  $0,2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  den Übergang von einer hohen ( $> 5 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a \text{ h}^{-1}$ ) zu einer niedrigen  $\text{AlkPA}/\text{Chl } a$  ( $< 3 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a \text{ h}^{-1}$ ). In dieser Dissertation wurde ebenfalls ein inverser hyperbolischer Zusammenhang zwischen der partikulären AlkPA (normiert) und der Phosphatkonzentration festgestellt (Abb. 3.11 a). Die Übergänge von einer niedrigen zu

einer hohen partikulären AlkPA fand bei etwa  $0,3 \mu\text{mol Phosphat l}^{-1}$  statt. Einem ganz ähnlichen Wert wie bei Nausch (1998) und Siuda und Chrost (1987). Die Grenze zwischen einer hohen und niedrigen partikulären AlkPA/Chl *a* war mit  $25 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a \text{ h}^{-1}$  jedoch wesentlich höher als bei Nausch (1998).

Doch nicht immer zeigt die AlkPA eine inverse Beziehung zur Phosphatkonzentration. Jamet et al. (1997) fanden im Pavin See (Frankreich) keine Zusammenhänge zwischen der AlkPA/Proteingehalt und dem DIP-Gehalt. Wichtig ist hierbei, dass die Beziehung zwischen der normierten AlkPA und der Phosphatkonzentration untersucht wird. Vergleicht man die unnormierte AlkPA mit der Phosphatkonzentration, könnte eine negative Korrelation lediglich auf der Zunahme der Planktonbiomasse unter Verbrauch von Phosphat bzw. auf dem Abbau der Planktonbiomasse gekoppelt mit einer Phosphatfreisetzung beruhen. Die AlkPA kann dabei einfach konstitutiver Natur sein und die Planktonbiomasse widerspiegeln (Jones 1972; Taga und Kobori 1978; Cao et al. 2010). Eine nicht vorhandene Abhängigkeit der normierten AlkPA von der Phosphatkonzentration kann darauf beruhen, dass Bakterien  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  nicht nur im Zuge einer P-Limitation, sondern auch aufgrund einer C-Limitation produzieren, um an den C-Anteil der DOP-Moleküle zu gelangen (Reichardt 1971). Siuda und Chrost (1987) zeigten für die Phytoplanktonbasierte und die gelöste AlkPA, nicht jedoch für die Bakterienbasierte AlkPA, ein inverses Verhältnis mit der Phosphatkonzentration. Hoppe und Ullrich (1999) berichteten im Indischen Ozean unterhalb der euphotischen Zone von einer Zunahme der AlkPA mit der Tiefe, zusammen mit einem Anstieg der Phosphatkonzentration. Hoppe und Ullrich (1999) schlussfolgerten daraus, dass C-limitierte Bakterien im Tiefenwasser für die erhöhte AlkPA verantwortlich waren, wodurch Phosphat akkumulierte. Hoppe (1983) beobachtete im hypertrophen Teil der Schlei eine hohe AlkPA, die in Richtung Mündung zur mesotrophen Ostsee abnahm (Tabelle 4.2). Mit diesem Gradienten sank auch die Bakterienabundanz und der Chl *a*-Gehalt. Da Phosphat, Nitrat und Ammonium in nicht limitierenden Mengen zur Verfügung standen, wurde postuliert, dass die Bakteriengemeinschaft die hohe AlkPA verursachte, um damit ihren C-Bedarf zu befriedigen (Hoppe 1983; Hoppe 2003). Nicholson et al. (2006) beschrieben in der Bucht von San Francisco (USA) häufige ELF®97-Markierungen an heterotrophen Bakterien, die an organischen und anorganischen suspendierten Partikeln anhafteten. Da hohe Phosphatkonzentrationen ( $1,5 - 15 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) und niedrige N:P-Verhältnisse (im Mittel 7:1) gegen eine P-Limitation sprachen und die AlkPA mit dem DIP- und DOM-Gehalt positiv korrelierte, wurde geschlussfolgert, dass die Bakterienbasierten  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  zur Kohlenstoffgewinnung produziert wurden (Nicholson et al. 2006). Sebastián et al. (2004) zeigten zwischen der Nordwestküste Afrikas und den Kanarischen Inseln im Auftriebsgebiet keine Hemmung der

AlkPA durch eine Phosphatzugabe ( $+ 1 \mu\text{mol Phosphat l}^{-1}$ ), während in den oligotrophen offshore Bereichen die AlkPA zwischen 50 und 96% gehemmt wurde (Tabelle 4.3). Mehrere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass bakterielle  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  die der C-Beschaffung dienen, durch hohe Phosphatkonzentrationen nicht gehemmt werden (Taga und Kobori 1978; Hoppe und Ullrich 1999; Sebastián et al. 2004; Cao et al. 2010). Faktoren die darauf hindeuten, dass die AlkPA vorwiegend der bakteriellen C-Remineralisation dient sind somit: eine positive Korrelation zwischen der normierten AlkPA und der Bakterienabundanz, hohe Phosphatkonzentrationen, C:N:P-Verhältnisse im Seston die keine P-Limitation und dafür eine C-Limitation anzeigen, keine Hemmung der AlkPA durch eine Phosphatzugabe.

Ein nicht vorhandener Zusammenhang zwischen Phosphatkonzentration und AlkPA beruht jedoch nicht zwangsläufig auf einer AlkPA, die von C-limitierten Bakterien produziert wurde. Nicholson et al. (2006) beobachteten in der Bucht von Monterey (USA) hohe DIP-Gehalte und niedrige DIN:DIP-Verhältnisse, die auf keine P-Limitation des Phytoplanktons schließen ließen, zusammen mit hohen AlkPA im Frühling und Sommer, die wiederum für eine P-Limitation sprachen. Die AlkPA korrelierte zudem nicht mit dem DIP-Gehalt. Messungen der AlkPA auf Artniveau mittels ELF®97-P zeigten, dass Dinoflagellaten häufig P-limitiert waren. Diese Algengruppe war für die messbare AlkPA verantwortlich, während die abundanteren Diatomeen nicht P-limitiert waren (Nicholson et al. 2006). Eine interspezifisch unterschiedliche Produktion von  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  trotz gleicher Phosphatangebote kann durch einen unterschiedlichen P-Bedarf, verschieden effiziente P-Aufnahmesysteme oder ein ungleiches Vermögen, Bestandteile des gelösten anorganischen Phosphorreservoirs zu nutzen, verursacht werden. Mixotrophe Phytoplankter sind in der Lage durch die Phagotrophie P-haltiger Partikel ihre P-Versorgung zu verbessern. Die inkorporierten P-haltigen Partikel werden vermutlich durch intrazelluläre  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  abgebaut (McLaughlin et al. 2013). In mixotrophen Phytoplanktern kann die AlkPA neben der P-Gewinnung auch der C-Gewinnung dienen (Johnson 2015).

Von Gage und Gorham (1985) wurde neben der AlkPA der zelluläre P-Gehalt (entspricht in dieser Arbeit dem PP-Gehalt) als weiterer P-Limitationsindikator beschrieben. Sie zeigten in natürlichen Phytoplanktongemeinschaften von neun verschiedenen Seen Minnesotas (USA) eine inverse hyperbolische Beziehung zwischen der AlkPA/POM und dem PP:POM-Verhältnis. Demnach produzieren Phytoplankter, denen ausreichend P zur Verfügung stehen, Polyphosphate als Reservestoffe („Luxus P-Aufnahme“). Dabei ist eine geringe AlkPA nur von konstitutiver Natur. Werden die Phytoplankter P-limitiert, zehren sie ihre zellulären P-Speicher auf, ersetzen Phospholipide mit Sulfolipiden und produzieren gleichzeitig  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$ , um zusätzlich organische P-Quellen nutzen zu können (Gage und Gorham 1985; Lin et al. 2016). Auch

Myklestad und Sakshaug (1983) beobachteten einen Anstieg der AlkPA mit der Abnahme des internen P-Gehalts einer natürlichen Diatomeenblüte, dominiert von *Skeletonema costatum*, im Trondheimfjord (Norwegen). In der Grünalge *Scenedesmus quadricauda* wurde ein Abfall des zellulären P-Gehalts, zusammen mit einem Anstieg der AlkPA, als Reaktion auf die Erschöpfung des Phosphatgehalts im Medium festgestellt (Healey und Hendzel 1979a). Im eutrophen Plußsee wurde ebenfalls eine inverse Beziehung zwischen der AlkPA/ATP der Phytoplanktonfraktion ( $> 3 \mu\text{m}$ ) und der Menge von Luxus-P-Speicherstoffen in der Phytoplanktonfraktion beschrieben (Chróst und Overbeck 1987). In dieser Dissertation wurde auch eine inverse hyperbolische Beziehung zwischen der partikulären AlkPA/PP und dem PP:POM-Verhältnis festgestellt (Abb. 3.11 c). Der Grenzwert für das PP:POM-Verhältnis, welches zwischen einer hohen und niedrigen partikulären AlkPA unterscheidet, ist dem von Gage und Gorham (1985) sehr ähnlich. Wenn die partikuläre AlkPA über den POM-Gehalt normiert wurde wie bei Gage und Gorham (1985), zeigte sich kein klares inverses hyperbolisches Verhältnis mehr (Daten nicht gezeigt). Unter PP:POM-Verhältnissen, die eine Überfluss-P-Akkumulation anzeigen, wurden dann auch hohe AlkPA/POM gemessen, die eine starke P-Limitation angeben (Falsch positiv). Ein möglicher Grund für falsch positive Ergebnisse könnte eine zeitliche Verschiebung zwischen dem tatsächlich auftretenden P-Mangel und der Messung der beständigen AlkPA sein. Martin et al. (2014) zeigten in einem Transekt vom westlichen Nordatlantik bis in die stark oligotrophe, P-limitierte Sargassosee einen Anstieg der AlkPA, des Schwefellipid:Phospholipid-Verhältnisses und des Polyphosphat:PP-Verhältnisses, zusammen mit der Abnahme des PP/Zelle und dem DIP-Gehalt. Ein höheres Polyphosphat:PP-Verhältnis im stark P-limitierten Phytoplankton der Sargassosee beruhte nicht auf einer Zunahme von Polyphosphaten, sondern auf der relativ stärkeren Abnahme des PP-Gehalts. Zelluläre P-Reserven wie Phospholipide, RNA und DNA wurden bevorzugt vor Polyphosphaten genutzt. P-limitierte Algen füllen bei einer P-Zufuhr ihre Polyphosphat-Speicher sehr schnell wieder auf (Martin et al. 2014; Braun et al. 2018). Aus diesem Polyphosphat-Speicher werden daraufhin die anderen zellulären P-Speicher wieder regeneriert (Grillo und Gibson 1979; Martin et al. 2014). Bei einem Wechsel von P-limitierten zu P-gesättigten Bedingungen steigt daher der PP-Gehalt sehr schnell an, während die AlkPA immer noch messbar ist. In der Diatomee *Phaeodactylum tricorutum* wurde unter P-limitierten Bedingungen die Expression der AlkP<sub>ase</sub>-mRNA und die gelöste und partikuläre AlkPA über mehrere Tage beobachtet (Lin et al. 2013). Mit dem Anstieg der Genexpression der AlkP<sub>ase</sub>-Gene nahm, etwas zeitversetzt, auch die gelöste und partikuläre AlkPA zu. Während die Expression des AlkP<sub>ase</sub>-Gens sehr schnell wieder langsam abnahm, blieb die gelöste und partikuläre AlkPA noch mehrere Tage auf hohem Niveau. Lin et al. (2013)

extrahierten die AlkP<sub>ase</sub> „PtAPase“ aus der Diatomee *Phaeodactylum tricornatum* und beobachteten, dass deren Enzymaktivität bei Raumtemperatur über mehrere Tage stabil blieb. Der zellinterne P-Gehalt ist damit ein zeitlich recht akkurater Anzeiger einer P-Limitation, während die AlkPA noch messbar ist, obwohl die akute P-Limitation bereits vorüber sein kann. Die Eignung der AlkPA als sensitiver P-Limitationsindikator hängt jedoch wesentlich davon ab, wie schnell sich Änderungen im zellinternen Nährstoffstatus in der AlkPA widerspiegeln. Die partikuläre AlkPA/PP scheint besser als die partikuläre AlkPA/POM geeignet zu sein, falsch positive Ergebnisse auszuschließen, da diese den sensitiveren Faktor PP-Gehalt mit einbezieht.

Die geringe Sensitivität der AlkPA auf eine plötzliche Erholung von der P-Limitation zeigten auch die Versuche mit Zingster Strom-Proben, denen verschiedenen Nähstoffe zugegeben wurden. Die Zugabe von 5 µmol Phosphat l<sup>-1</sup> führte lediglich zu einer Reduktion der AlkPA/PepA zwischen 7 und 55% nach 24 Stunden bzw. zwischen 38 und 86% nach 7 Tagen (Abb. 3.14). Die hohen Spannweiten zwischen den Werten könnte an einer unterschiedlichen Phytoplanktonzusammensetzung zwischen den Probenahmezeitpunkten liegen. Die Phosphatdüngemenge überstieg um ein Vielfaches die im Zingster Strom vorkommende Phosphatkonzentration. Die zugebenen 5 µmol Phosphat l<sup>-1</sup> wurden allerdings nach 24 Stunden meist komplett aufgenommen (Abb. A26). Im Ontariosee (Nordamerika) zeigten Phosphatzugaben erst dann hemmende Effekte auf die AlkPA, wenn diese sehr viel größer waren als die maximale in-situ Phosphatkonzentration (Pick 1987; Tabelle 4.3). Da die messbare AlkPA auf die Zugabe von Phosphat weder schnell noch im erwarteten Umfang reagierte, schlussfolgerte Pick (1987), dass die AlkPA kein sensitiver Marker für eine P-Limitation in Phytoplanktonproben ist. Auch andere Studien berichten, dass signifikante Hemmungen der AlkPA nur durch den Einsatz hoher Phosphatkonzentrationen stattfinden, welche in den Gewässern so nicht vorkommen (Reichardt et al. 1967; Jones 1972; Perry 1972; Jansson et al. 1981, Tabelle 4.3). Im Gegensatz dazu beschrieben Rose und Axler (1998) in zwei von vier Seen in Michigan (USA) Hemmungen der AlkPA nach drei bis vier Tagen von 80 bis 100% bei einer geringen Phosphatzugabe von 0,3 µmol l<sup>-1</sup> (Tabelle 4.3).

Phosphationen beeinflussen die AlkPA auf zweierlei Weise. Sie konkurrieren mit dem Substrat um die aktive Bindungsstelle des Enzyms und hemmen diese für das Substrat kompetitiv. Eine kompetitive Phosphathemmung zeigt keine Auswirkungen auf die gemessene V<sub>max</sub>-Werte, weil unter hohen Substratkonzentrationen die Phosphationen mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit als das Substrat an das Enzym binden können und damit verdrängt werden. Die kompetitive Phosphathemmung erhöht allerdings die K<sub>M</sub>-Werte, da die Affinität des Enzyms zu dem

Substrat, durch die Affinität zum anhaftenden Inhibitor, herabgesetzt wird (Bergmeyer und Gawehn 1977; Chróst und Overbeck 1987, Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Die Hemmung der alkalinen Phosphataseaktivität nach Zugaben von Phosphat, im Vergleich zwischen verschiedenen Studien

Gewässer Besonderheiten	in-situ DIP ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	Phosphatzu- gabe ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	Veränderung der AlkPA	Quelle
Ontariosee, Nordamerika, 0 – 18 Stunden nach P-Zugabe	0 – 0,2	1 – 1,3 2 3	- 50% - 63% - 73%	Pick 1987
Nordwest-Atlantik, Zwischen Afrika und den Kanaren, Zeit nicht angegeben Auftriebsgebiet	0,04 – 0,16	0,5 1	0% - 20%	Sebastián et al. 2004
Offshore oligotroph	0,04 – 0,04	0,1 0,5 1	- 50% - 60 – 80% - 80 – 96%	
Zingster Strom, Lagune AlkPA/PepA nach 24 Stunden	0,0 – 0,5	5 (+P) 5 (+NP 15:1) 20 (+NP 4:1)	- 20 $\pm$ 17% - 12 $\pm$ 16% - 23 $\pm$ 16%	Eigene Daten
AlkPA/PepA nach 7 Tagen		5 (+P) 5 (+NP 15:1) 20 (+NP 4:1)	- 58 $\pm$ 16% - 58 $\pm$ 12% - 70 $\pm$ 13%	
Michigan, USA, August AlkPA/Chl <i>a</i> nach 7 – 8 Tagen Thrush Lake, NP-Kolimit. Dunnigan Lake, NP-Kolimit. Divide Lake, N-Limitation Sand Lake, N-Limitation	Nicht angegeben	0,3	Blieb niedrig + 130% - 100% - 80%	Rose und Axler 1998
Golf von Biskaya, Flussfahne des Gironde Ästuars Partikuläre AlkPA/C <sub>Phytoplankter</sub> nach 4 – 6 Tagen	0,001 – 0,334	0,6 (Endkon- zentration)	Bei niedriger Start-AlkPA keine Hemmung Bei hoher Start- AlkPA 88%	Labry et al. 2005
Plußsee, Deutschland, eutroph Direkt nach Phosphatzugabe	0,0 – 5,5		V <sub>max</sub> blieb gleich K <sub>M</sub> stieg an	Chróst und Overbeck 1987
Algen K <sub>M</sub>		3,2	+ 93%	
Algen K <sub>M</sub>		4,8	+ 165%	
Bakterien K <sub>M</sub>		3,2	+ 21%	
Bakterien K <sub>M</sub>		4,8	+ 26%	

AlkPA = alkaline Phosphataseaktivität; DIP = gelöster anorganischer Phosphor; K<sub>M</sub> = Michaeliskonstante;  
P = Phosphor; N = Stickstoff

Aufgrund der schnellen Aufnahme der Phosphationen durch Mikroorganismen, sollte eine kompetitive Hemmung direkt nach der Phosphatzugabe bestimmt werden. Eine Langfristige



Auswirkung der Phosphationen auf die AlkPA bezieht sich auf die Repression der Transkription der  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$ -Gene. Dadurch sinkt die Produktion der  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  und damit  $V_{\text{max}}$ . Der  $K_M$  bleibt gleich, da sich an der Affinität der verbleibenden Enzyme zum Substrat nichts ändert, nur weil die  $\text{AlkP}_{\text{ase}}$ -Produktion eingestellt wurde. In den Nährstoffexperimenten mit den Zingster Strom-Proben stieg der  $K_M$  nach 24 Stunden und nach sieben Tagen an oder sank ab. Selten blieben die  $K_M$ -Werte nahezu unverändert (Abb. 3.15). Da nicht ermittelt wurde wie viele unterschiedliche  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  an der AlkPA beteiligt waren, könnten diese Veränderungen des  $K_M$  auf der Produktion von  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  beruhen, die einen anderen  $K_M$  hatten als die vorhandenen  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  vor der Nährstoffzugabe.

Neben der geringen zeitlichen Sensitivität bringt auch die hohe zeitliche und räumliche Variabilität der AlkPA, die, verursacht durch horizontale und vertikale Wasserbewegungen, sehr hoch ausfallen kann, Probleme in der Nutzbarkeit der AlkPA als zuverlässigen P-Limitationsindikator. Pick (1987) berichtete in der Mitte des Ontariosees (Nordamerika) von hohen AlkPA, die plötzlich auftraten und auf horizontale Wasserbewegungen zurückzuführen waren. Er beschrieb auch tägliche Veränderungen in der AlkPA, die durch Windereignisse und der Ausbreitung einer Kelvinwelle zustande gekommen waren (Pick 1987). Berman (1970) zeigte im See Genezareth (Israel) einen Anstieg der AlkPA vom Morgen zum späten Nachmittag bis Abend. Dieser Anstieg der AlkPA wurde mit dem Phosphatverbrauch durch die Primärproduktion am Tag begründet. Horizontalen Wasserbewegungen, die im See Genezareth durchaus vorkommen, wurden auch als mögliche Ursache in Betracht gezogen (Berman 1970). Wetzel (1981) zeigte im oligotrophen Lawrence See (USA), in dem er über sechs Jahre hinweg engmaschig die gesamte Wassersäule beprobte, einen klaren Einfluss von Schichtung und Zirkulation der Wassersäule auf die Höhe der AlkPA im Frühling. Štrojsová und Vrba (2009) berichteten im P-limitierten Phytoplankton des Římov Reservoir und des Plešné Sees (Tschechische Republik) von hohen, kurzzeitigen Schwankungen in der Artspezifischen- und Gesamt-AlkPA, welche teilweise auf Umwälzungen der Wasserschichten zurückgeführt werden konnten. Zum Beispiel sank im Plešné See die Gesamt-AlkPA gegen Nachmittag des zweiten Beprobungstages aufgrund eines plötzlichen Südwindes ab, wodurch eine andere Planktonpopulation mit einer niedrigeren AlkPA aus einer tieferen Wasserschicht an die Oberfläche verdriftet wurde (Štrojsová und Vrba 2009). Diese Studien zeigen, dass zur Interpretation der AlkPA engmaschige Probenahmen und Kenntnisse über die Hydrographie im Gewässer wichtig sein können.

#### 4.4 Die Eignung der Michaeliskonstante als Indikator einer Phosphorlimitation

Alkaline Phosphomonoesterasen besitzen generell eine breite Enzymspezifität. Dadurch können sie unterschiedliche Substrate binden und spalten (Cembella et al. 1984; Hoppe 2003). Eine Anpassung innerhalb einer Art von niedrig- zu hochaffinen Enzymen im Zuge einer steigenden Phosphatlimitation, wie es von Phosphatbindeproteinen bekannt ist, findet bei den AlkP<sub>asen</sub> nicht statt. Trotzdem wurde der Zusammenhang zwischen dem  $K_M$  der AlkP<sub>asen</sub> und der Phosphatkonzentration in vielen Gewässern und Algenkulturen mehrfach untersucht. Dabei wurden in vielen Studien keine Zusammenhänge beschrieben, während in anderen Studien eine Verknüpfung von  $K_M$  und Phosphatkonzentration gezeigt wurden. Degerholm et al. (2006) beschrieb z.B. in den zwei Cyanobakterien-Kulturen aus der Ostsee, *Nodularia* sp. und *Aphanizomenon* sp., keine Anpassung des  $K_M$  auf eine P-Limitation im Medium (Tabelle 4.1). Labry et al. (2005) beobachteten im Golf von Biskaya (Nordost-Atlantik), in der Flussfahne des Gironde Ästuars, bereits zum Ende des Winters eine extreme P-Limitation, die durch eine Diatomeenblüte im Spätwinter verursacht wurde. Im Frühling wurde das Phytoplankton daher von Pico- und Nanophytoplanktern dominiert, die mit den geringen Phosphatkonzentrationen umgehen konnten. Mit der sinkenden Phosphatkonzentration stieg die unnormierte AlkPA und die AlkPA/Chl *a* vom Spätwinter bis zum Spätfrühling an. Der  $K_M$  blieb jedoch gleich (Tabelle 4.2). Die Daten dieser Dissertation zeigten, dass der Zingster Strom stärker P-limitiert war als die Warnow. Die  $K_M$ -Werte des Zingster Stroms waren jedoch nicht signifikant kleiner als die  $K_M$ -Werte der Warnow (Tabelle A4). Und auch im Zuge der Nährstoffexperimente reagierten die  $K_M$ -Werte des Zingster Stroms unterschiedlich auf eine Verstärkung der P-Limitation bzw. auf eine Änderung zur N-Limitation (Tabelle 3.5). In der Ostsee und im Zingster Strom, und auch im Vergleich zwischen den drei untersuchten Gewässern, bestand kein Zusammenhang zwischen dem  $K_M$  und dem DIP-Gehalt (Tabelle 3.4, A7 und A9). Nur in der Warnow zeigte der  $K_M$  mit dem DIP-Gehalt eine schwache positive Korrelation (Tabelle A8). Auch in anderen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen dem Status der P-Limitation und dem  $K_M$  festgestellt. Pettersson (1980) beobachtete im Erkensee (Schweden) eine Verringerung der  $K_M$ -Werte (Substrataffinität stieg) um eine ganze Größenordnung unter P-limitierenden Bedingungen im Frühling, im Vergleich zu N-limitierten Bedingungen im Spätsommer. Im eutrophen Plußsee wurde von Reichardt (1971) eine positive Korrelation zwischen dem  $K_M$  und dem DIP-Gehalt beschrieben. Damit sank im Plußsee die Affinität der AlkP<sub>asen</sub> zu dem artifiziellen Substrat, wenn ausreichend Phosphat zur Verfügung stand. Auch Chrost und Overbeck (1987) beobachteten im Plußsee eine mittlere positive Korrelation zwischen dem  $K_M$  und dem DIP-Gehalt. Diese Korrelation nahm zu, wenn der DIP-Gehalt zusätzlich durch den enzymatisch

hydrolysierbaren Anteil des DOP-Gehalts dividiert wurde. Chrost und Overbeck (1987) schlussfolgerten, dass der  $K_M$  von der Phosphatkonzentration und von der enzymatisch hydrolysierbaren DOP-Konzentration abhängig ist. Umgekehrt reagierte *Anacystis nidulans* in Kultur auf die Abwesenheit von Phosphat und auf die Zugabe von verschiedenen DOP-Substraten meist mit einer Zunahme der Substrataffinität (Reichardt 1971). Diese positiven Korrelationen zwischen dem  $K_M$  und der Phosphatkonzentration können damit erklärt werden, dass hohe Phosphatkonzentrationen im Gewässer die  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  kompetitiv hemmen und dadurch der  $K_M$  ansteigen bzw. umgekehrt, bei niedrigen Phosphatkonzentrationen die kompetitiven Hemmungen enden und der  $K_M$  sinkt (Vergleich Diskussion 4.3.3). In Gewässern wie dem Zingster Strom, in dem die Menge der  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  aufgrund einer ganzjährigen P-Limitation die Menge der Phosphationen um ein Vielfaches übersteigt, sodass selbst bei kurzfristig hohen Phosphatkonzentrationen eine kompetitive Hemmung klein oder nur von kurzer Dauer ist, ist ein nicht vorhandener Zusammenhang zwischen den  $K_M$ -Werten und dem DIP-Gehalt nicht verwunderlich. Um eine vorhandene Beziehung zwischen dem  $K_M$  und der Phosphatkonzentration festzustellen, müssen durch die Probenahme beide Szenarien gleichermaßen erfasst werden. Wenn allerdingst zum Ende einer P-Limitation in dem kurzen Zeitraum, wenn die Phosphatkonzentration wieder ansteigt und die noch nicht abgebauten  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$  kompetitiv gehemmt werden, keine Probenahme stattfindet, wird ein vorhandener Zusammenhang nicht festgestellt. Wie bereits weiter oben erwähnt, werden  $\text{AlkP}_{\text{asen}}$ , die von C-limitierten Bakterien synthetisiert werden, nicht von Phosphationen kompetitive gehemmt. Ein fehlender Zusammenhang zwischen der Phosphatkonzentration und dem  $K_M$  kann somit auch in Gewässern vorkommen, in denen C-limitierte Bakterien wesentlich zum  $\text{AlkP}_{\text{ase}}$ -Reservoir beitragen. Solch eine Störung kann vermieden werden, wenn der  $K_M$  direkt in der Phytoplanktonbasierten Größenfraktion ermittelt wird und der Anteil von Partikel-assoziierten C-limitierten Bakterien an der Phytoplanktonbasierten Größenfraktion klein ist.

## 5. Schlussfolgerung

Zum Schluss möchte ich nochmal auf die eingangs gestellten Hypothesen zurückkommen. In der ersten Hypothese wurde postuliert, dass die Entscheidung für einen Normierungsparameter das Ergebnis und die Interpretation der AlkPA wesentlich beeinflusst. Diese Hypothese konnte bestätigt werden. Sowohl der Zeitpunkt der AlkPA-Maxima und -Minima innerhalb eines Gewässers als auch die maximale AlkPA im Vergleich zwischen verschiedenen Gewässern änderte sich mit der Wahl des Normierungsparameters. Ob Zusammenhänge zwischen der AlkPA und anderen P-Limitationsindikatoren bestanden, war von dem Normierungsparameter abhängig. Die Interpretation der AlkPA mithilfe der Grenzwerte aus der Literatur änderte sich ebenfalls mit der Wahl des Normierungsparameters und des dazugehörigen Grenzwertes. Diese Ergebnisse zeigen, wie essenziell die richtige Normierung der AlkPA zur Beurteilung des P-Status ist und, dass durch eine Normierung mit einem ungeeigneten Normierungsparameter die Ergebnisse falsch interpretiert werden können. Eine Korrelationsanalyse zwischen verschiedenen Biomasseparametern und der partikulären AlkPA ist zur alleinigen Bestimmung der AlkP<sub>asen</sub>-produzierenden Organismengruppe ungeeignet. Eine Größenfraktionierung der partikulären AlkPA in eine Bakterien- und Phytoplanktonfraktion ist sinnvoll und sollte, anders als in dieser Dissertation, bei jeder AlkPA-Messung durchgeführt werden, da zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Organismengruppen an der Produktion der AlkP<sub>asen</sub> beteiligt sein können. Zusätzlich sollte bei jeder Messung geprüft werden, welchen Anteil Partikel-assoziierte Bakterien an der Phytoplanktonfraktion bzw. Phytoplankter an der Bakterienfraktion ausmachen. Um die Normierung der AlkPA weiter zu optimieren, sollten die Normierungsparameter in der Bakterien- und Phytoplanktonfraktion direkt bestimmt werden. Die Auswertung der Daten zeigte, dass der Vergleich der unterschiedlich normierten partikulären AlkPA mit verschiedenen P-Limitationsindikatoren, wie den PN:PP-, PC:PP- und PP:POM-Verhältnissen, helfen kann den geeignetsten Normierungsparameter auszuwählen.

In der zweiten Hypothese wurde angenommen, dass die Grenzwerte aus der Literatur zur Interpretation der AlkPA sich nicht auf jedes Gewässer übertragen lassen. Diese Hypothese konnte ebenfalls bestätigt werden. Für die Grenzwerte der partikulären AlkPA/Chl *a* konnte gezeigt werden, dass diese für einige Gewässer geeignet sind, für andere wiederum nicht. Die Grenzwerte für die partikuläre AlkPA/POC sind so hoch angesetzt, dass ein Berechnungsfehler wahrscheinlich ist. Fehlende Studien zum Vergleich, in denen die partikuläre AlkPA/POC genutzt wurden, lassen jedoch keine abschließenden Schlussfolgerungen zu. Zumindest für die drei untersuchten Gewässer waren die Grenzwerte der partikulären AlkPA/POC völlig

ungeeignet. Die Interpretation der AlkPA mit den Grenzwerten für die partikuläre AlkPA/PP zeigte die besten Übereinstimmungen mit den vergleichend untersuchten P-Limitationsindikatoren. Falsch negative Interpretationen der AlkPA/PP kamen jedoch häufig vor. Auch hier fehlen Studien zum Vergleich, in denen die partikuläre AlkPA/PP genutzt wurde, um die Übertragbarkeit dieser Grenzwerte auf alle Gewässer zu bestätigen. Vermutlich ist es nicht möglich einen Grenzwert zu finden, der für alle Gewässer gleichzeitig seine Gültigkeit hat. Selbst in einem Gewässer, zu unterschiedlichen Jahreszeiten oder Jahren beprobt, können unterschiedliche Grenzen zwischen einer P-Limitation und keiner P-Limitation gelten. Anstatt sich auf einen Grenzwert aus der Literatur zu verlassen, sollte für jedes Gewässer individuell ein Grenzwert mithilfe von Langzeitdaten bestimmt werden. Dafür erwies sich der Vergleich der partikulären AlkPA mit den P-Limitationsindikatoren PN:PP, PC:PP und PP:POM und der Phosphatkonzentration als sinnvoll. Der Vergleich mit dem DIN:DIP-Verhältnis zeigte sich als weniger nützlich.

In der dritten Hypothese wurde postuliert, dass die AlkPA, mit ihren Parametern  $V_{\max}$  und  $K_M$ , nicht geeignet ist, den Status des P-Bedarfs einer Phytoplanktongemeinschaft sicher einzuschätzen. Diese Hypothese konnte teilweise bestätigt werden. Die gelöste AlkPA ist als P-Limitationsindikator ungeeignet, da eine Normierung aufgrund der ungewissen Herkunft nicht möglich ist und die zeitliche Sensitivität der gelösten AlkPA aufgrund ihrer Langlebigkeit gering ist. Die gelöste AlkPA kann einen großen Anteil an der Gesamt-AlkPA ausmachen und sollte daher immer von der dieser abgezogen werden. Für die Nutzung der partikulären AlkPA als P-Limitationsindikator ist eine optimale Normierung ausschlaggebend, um Missinterpretationen zu vermeiden. Häufig ist nur ein kleiner Teil der Phytoplanktongemeinschaft von einer P-Limitation betroffen, während die abundantesten Arten nicht P-limitiert sind. Wird in einem solchen Fall die partikuläre AlkPA mit einem Biomasseparameter normiert, der die gesamte Phytoplanktongemeinschaft beschreibt, kann dies zu falsch negativen Ergebnissen führen. Der Vergleich mit anderen P-Limitationsindikatoren, wie den N:P- und C:P-Verhältnissen im Seston, ist in einem solchen Fall ebenfalls nicht hilfreich, da auch diese Parameter die Gesamtheit der Phytoplanktongemeinschaft repräsentieren. Falsch positive Ergebnisse der partikulären AlkPA sind seltener. Sie können durch den zeitlichen Versatz zwischen dem Ende einer P-Limitation und der noch messbaren partikulären AlkPA verursacht werden. Zusätzlich kann die partikuläre AlkPA an einem Probenahmestandort durch vertikale und horizontale Wasserbewegungen eine starke zeitliche und räumliche Variabilität zeigen. So können innerhalb eines Tages die Ergebnisse unterschiedlich ausfallen, je nachdem wann man die Proben genommen hat und welche Phytoplanktonpopulation man in dem Moment beprobt hat. Der  $K_M$  ist als

allgemeiner Indikator einer P-Limitation nicht geeignet, da das Verhalten des  $K_M$  auf eine P-Limitation in verschiedenen Gewässern und Algenarten nicht einheitlich ist. Es bleibt die Frage, ob die  $K_M$ -Werte zwischen verschiedenen Gewässern und Probenahmezeitpunkten überhaupt vergleichbar sind, wenn sich die Phytoplanktonzusammensetzungen unterscheiden. Es besteht noch sehr wenig Wissen darüber, wie viele verschiedene  $AlkP_{asen}$  in einer Algenart vorkommen und wie sich die verschiedenen  $AlkP_{asen}$  in ihrer Affinität zu den verwendeten artifiziellen Substraten unterscheiden. Eine Änderung des  $K_M$  über die Zeit kann lediglich die Folge von Änderungen im  $AlkP_{ase}$ -Reservoir sein.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass die gelöste AlkPA und der  $K_M$  nicht als P-Limitationsindikatoren nutzbar sind. Die partikuläre AlkPA ist als P-Limitationsindikator geeignet, jedoch fehleranfällig. Die größenfraktionierte AlkPA-Messung, häufige Probenahmen mit kurzen Intervallen, die Langzeitdatensammlung und der Vergleich mit anderen P-Limitationsindikatoren können diese Fehler minimieren, machen die Nutzung der AlkPA als P-Limitationsindikator jedoch auch arbeits- und zeitaufwendig. Die Verwendung des Substrats ELF®97-P zur direkten Markierung von P-limitierten Algenzellen ist im Vergleich dazu nicht arbeitsintensiver und liefert auch bei einer einzigen Probenahme gute Ergebnisse. Falsch negative Ergebnisse werden vermieden, da die  $AlkP_{ase}$ -produzierenden Organismen direkt markiert werden und unterschiedliche Stufen einer P-Limitation können inter- und intraspezifisch festgestellt werden. Falsch negative Ergebnisse können mit dieser Methode ebenfalls auftreten, da auch hier ein zeitlicher Versatz zwischen der tatsächlichen P-Limitation und der noch nicht abgebauten AlkPA vorkommen kann. Möchte man mehrere Gewässer und viele Proben miteinander vergleichen, kann die AlkPA-Markierung mit ELF®97-P zu arbeitsaufwendig werden, da dabei für jede Algenart mehrere Zellen ausgezählt werden müssen, um die Ergebnisse statistisch abzusichern, und dies natürlich für jede Algenart und in jeder Probe. Als Alternative könnten molekularbiologische Methoden genutzt werden, um das Expressionslevel der  $AlkP_{ase}$ -Gene zu bestimmen. Dabei würden nicht nur falsch negative Ergebnisse, sondern auch falsch positive Ergebnisse vermieden werden, da das Ende einer P-Limitation sehr schnell in dem Expressionslevel der  $AlkP_{ase}$ -Gene ersichtlich ist. Zu dem jetzigen Zeitpunkt sind jedoch die  $AlkP_{asen}$  der Mikroalgen noch nicht sehr gut beschrieben und die bereits identifizierten  $AlkP_{ase}$ -Gene zeigen eine hohe Sequenzdivergenz (Lin et al. 2016). Die zelluläre Signalantwort im Zuge einer P-Limitation in Bakterien und Mikroalgen bietet weitere Möglichkeiten eine P-Limitation zu detektieren. Zum Beispiel die Hochregulation von Genen für hochaffine Phosphattransportproteine, oder Gene zur Änderung der Phosphatallokation wie die Substitution von Phospholipiden mit Sulfolipiden. Die zelluläre Signalantwort im Zuge einer P-Limitation ist jedoch in Bakterien und

Mikroalgen nicht konserviert und kann beträchtlich zwischen verschiedenen Mikroorganismen variieren (Karl 2014; Lin et al. 2016). Hier bedarf es der weiteren Forschung, um Markergene zu bestimmen, die zumindest in vielen Bakterien oder Mikroalgen gleich sind.

## 6. Literatur

- Albrecht M, Pröschold T, Schumann R (2017) Identification of cyanobacteria in a eutrophic coastal lagoon on the southern baltic coast. *Front Microbiol* 8:923. doi: 10.3389/fmicb.2017.00923
- Andersen-Elvehoy IL, Thingstad TF (1991) Detection of limiting factors for bacterial activity using protease activity. *Kieler Meeresforschungen Sonderh* 8:392–398.
- Artigas LF (1998) Seasonal variability in microplanktonic biomasses in the Gironde dilution plume (Bay of Biscay): Relative importance of bacteria. *Oceanol Acta* 21:563–580. doi: 10.1016/S0399-1784(98)80039-X
- Atkins GL, Nimmo IA (1975) A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochem J* 149:775–777. doi: 10.1016/0039-9140(75)80147-0
- Bachor A (2005) Nährstoffeinträge in die Küstengewässer Mecklenburg-Vorpommerns – eine Belastungsanalyse. *Rostocker Meeresbiologische Beiträge* 14:17–32.
- Bahnwart M, Hübener T, Schubert H (1999) Downstream changes in phytoplankton composition and biomass in a lowland river-lake system (Warnow River, Germany). *Hydrobiologia* 391:99–111. doi: 10.1023/A:1003558209411
- Baudler H (2004) Der Salzgehalt und N-Nährstoffhaushalt in der Darß Zingster Boddenkette. *Rostocker Meeresbiologische Beiträge* 13:241–246.
- Beardall J, Young E, Roberts S (2001) Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquat Sci* 63:44–69. doi: 10.1007/PL00001344
- Bennett EM, Carpenter SR, Caraco NF (2001) Human impact on erodable phosphorus and eutrophication: A global perspective. *Bioscience* 51:227–234. doi: 10.1641/0006-3568(2001)051[0227:HIOEPA]2.0.CO;2
- Bergmeyer HU, Gawehn K (1977) *Grundlagen der enzymatischen Analyse*, 1st edn. Verlag Chemie
- Berman T (1970) Alkaline phosphatases and phosphorus availability in Lake Kinneret. *Limnol Oceanogr* 15:663–674.
- Berman T, Wynne D, Kaplan B (1990) Phosphatases revisited: Analysis of particle associated enzyme activities in aquatic systems. *Hydrobiologia* 207:287–294.



- Berthold M, Wulff R, Reiff V, et al (2019) Magnitude and influence of atmospheric phosphorus deposition on the southern Baltic Sea coast over 23 years: implications for coastal waters. *Environ Sci Eur* 31:27. doi: 10.1186/s12302-019-0208-y
- Bertilsson S, Berglund O, Karl DM, Chisholm SW (2003) Elemental composition of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: Implications for the ecological stoichiometry of the sea. *Limnol Oceanogr* 48:1721–1731. doi: 10.4319/lo.2003.48.5.1721
- BLANO (2014) Harmonisierte Hintergrund- und Orientierungswerte für Nährstoffe und Chlorophyll a in den deutschen Küstengewässern der Ostsee sowie Zielfrachten und Zielkonzentrationen für die Einträge über die Gewässer; Hintergrundbericht Nährstoffreduktionsziele Ostse. Bund/Länder-Ausschuss Nord- und Ostsee
- Boavida MJ, Heath RT (1984) Are the phosphatases released by *Daphnia magna* components of its food? *Limnol Oceanogr* 29:641–645. doi: 10.4319/lo.1984.29.3.0641
- Bochdansky AB, Puskaric S, Herndl GJ (1995) Influence of zooplankton grazing on free dissolved enzymes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 121:53–63. doi: 10.3354/meps121053
- Bogé G, Lespilette M, Jamet D, Jamet JL (2012) Role of sea water DIP and DOP in controlling bulk alkaline phosphatase activity in N.W. Mediterranean Sea (Toulon, France). *Mar Pollut Bull* 64:1989–1996. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.07.028
- Bogé G, Lespilette M, Jamet D, Jamet JL (2017) Role of DOP on the alkaline phosphatase activity of size fractionated plankton in coastal waters in the NW Mediterranean Sea (Toulon Bay, France). *Mar Pollut Bull* 117:264–273. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.11.037
- Böök IM, Saborowski R (2020) Extracellular phosphoesterases of invertebrate origin: underrated actors in phosphorus recycling? *Mar Biol* 167:47. doi: 10.1007/s00227-020-3654-6
- Bratbak G, Thingstad F, Heldal M (1994) Viruses and the microbial loop. *Microb Ecol* 28:209–221. doi: 10.1007/BF00166811
- Braun PD, Schulz-Vogt HN, Vogts A, Nausch M (2018) Differences in the accumulation of phosphorus between vegetative cells and heterocysts in the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Sci Rep* 8:5651. doi: 10.1038/s41598-018-23992-1
- Cao X, Song C, Zhou Y, et al (2009) Extracellular phosphatases produced by phytoplankton

- and other sources in shallow eutrophic lakes (Wuhan, China): Taxon-specific versus bulk activity. *Limnology* 10:95–104. doi: 10.1007/s10201-009-0265-9
- Cao X, Song C, Zhou Y (2010) Limitations of using extracellular alkaline phosphatase activities as a general indicator for describing P deficiency of phytoplankton in Chinese shallow lakes. *J Appl Phycol* 22:33–41. doi: 10.1007/s10811-009-9422-0
- Carpenter SR, Caraco NF, Correll DL, et al (1998) Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecol Appl* 8:559–568. doi: 10.1890/1051-0761(1998)008[0559:NPOSWW]2.0.CO;2
- Caruso G (2010) Leucine aminopeptidase,  $\beta$ -glucosidase and alkaline phosphatase activity rates and their significance in nutrient cycles in some coastal Mediterranean sites. *Mar Drugs* 8:916–940. doi: 10.3390/md8040916
- Carvalho WF, Granéli E (2010) Contribution of phagotrophy versus autotrophy to *Prymnesium parvum* growth under nitrogen and phosphorus sufficiency and deficiency. *Harmful Algae* 9:105–115. doi: 10.1016/j.hal.2009.08.007
- Cembella AD, Antia NJ, Harrison PJ (1984) The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A multidisciplinary perspective: Part 1. *Crit Rev Microbiol* 10:317–391. doi: 10.3109/10408418209113567
- Chróst RJ (1991) *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer, New York
- Chróst RJ, Münster U, Rai H, et al (1989) Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in the euphotic zone of a eutrophic lake. *J Plankton Res* 11:223–242.
- Chróst RJ, Overbeck J (1987) Kinetics of alkaline phosphatase activity and phosphorus availability for phytoplankton and bacterioplankton in lake Plußsee (North German Eutrophic Lake). *Microb Ecol* 13:229–248. doi: 10.1007/BF02025000
- Chrost RJ, Siuda W, Halemejko GZ (1984) Longterm studies on alkaline phosphatase activity (APA) in a lake with fish-aquaculture in relation to lake eutrophication and phosphorus cycle. *Arch. für Hydrobiol.* 70:1–32.
- Condon RH, Steinberg DK, Bronk DA (2010) Production of dissolved organic matter and inorganic nutrients by gelatinous zooplankton in the York River estuary, Chesapeake Bay. *J Plankton Res* 32:153–170. doi: 10.1093/plankt/fbp109

- Cooper RA, Bowen ID, Lloyd D (1974) The properties and subcellular localization of acid phosphatases in the colourless alga, *Polytomella caeca*. *J Cell Sci* 15:605–618.
- Degerholm J, Gundersen K, Bergman B, Söderbäck E (2006) Phosphorus-limited growth dynamics in two Baltic Sea cyanobacteria, *Nodularia* sp. and *Aphanizomenon* sp. *FEMS Microbiol Ecol* 58:323–332. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00180.x
- Diaz J, Ingall E, Benitez-Nelson C, et al (2008) Marine polyphosphate: A key player in geologic phosphorus sequestration. *Science* (80- ) 320:652–655.
- DIN 11732 (2005) Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von Ammoniumstickstoff - Verfahren mittels Fließanalytik (CFA und FIA) und spektrometrischer Detektion.
- DIN 13395 (1996) Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von Nitritstickstoff, Nitratstickstoff und der Summe von beiden mit der Fließanalytik (CFA und FIA) und spektrometrischer Detektion.
- DIN 38412 (1985) Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L): Bestimmung des Chlorophyll a Gehaltes von Oberflächengewässern.
- Duhamel S, Dyhrman ST, Karl DM (2010) Alkaline phosphatase activity and regulation in the North Pacific Subtropical Gyre. *Limnol Oceanogr* 55:1414–1425. doi: 10.4319/lo.2010.55.3.1414
- Dyhrman ST, Jenkins BD, Rynearson TA, et al (2012) The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse phosphorus stress response. *PLoS One* 7:e33768. doi: 10.1371/journal.pone.0033768
- Dyhrman ST, Palenik B (1999) Phosphate stress in cultures and field populations of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphate assay. *Appl Environ Microbiol* 65:3205–3212. doi: 10.1128/aem.65.7.3205-3212.1999
- Felgentreu L, Nausch G, Bitschofsky F, et al (2018) Colorimetric chemical differentiation and detection of phosphorus in eutrophic and high particulate waters: Advantages of a new monitoring approach. *Front Mar Sci* 5:212. doi: 10.3389/fmars.2018.00212
- Fennel K (1999) Convection and the timing of phytoplankton spring blooms in the western Baltic Sea. *Estuar Coast Shelf Sci* 49:113–128. doi: 10.1006/ecss.1999.0487
- Finkel ZV, Beardall J, Flynn KJ, et al (2010) Phytoplankton in a changing world: Cell size and elemental stoichiometry. *J Plankton Res* 32:119–137. doi: 10.1093/plankt/fbp098

- Fitzgerald GP, Nelson TC (1966) Extractive and enzymatic analyses for limiting or surplus phosphorus in algae. *J Phycol* 2:32–37. doi: 10.1111/j.1529-8817.1975.tb04539.x
- Francko DA (1984) Relationships between phosphorus functional classes and alkaline phosphatase activity in reservoir lakes. *J Freshw Ecol* 2:541–547.
- Gage MA, Gorham E (1985) Alkaline phosphatase activity and cellular phosphorus as an index of the phosphorus status of phytoplankton in Minnesota lakes. *Freshw Biol* 15:227–233. doi: 10.1111/j.1365-2427.1985.tb00195.x
- Gobler CJ, Hutchins DA, Fisher NS, et al (1997) Release and bioavailability of C, N, P, Se, and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte. *Limnol Ocean* 42:1492–1504. doi: 10.1039/c5dt02532j
- González-Gil S, Keafer BA, Jovine RVM, et al (1998) Detection and quantification of alkaline phosphatase in single cells of phosphorus-starved marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 164:21–35.
- Grillo JF, Gibson J (1979) Regulation of phosphate accumulation in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *J Bacteriol* 140:508–517.
- Grossart HP, Simon M (1998) Bacterial colonization and microbial decomposition of limnetic organic aggregates (lake snow). *Aquat Microb Ecol* 15:127–140. doi: 10.3354/ame015115
- Hallmann A (1999) Enzymes in the extracellular matrix of *Volvox*: an inducible, calcium-dependent phosphatase with modular composition. *J Biol Chem* 274:1691–1697. doi: 10.1074/jbc.274.3.1691
- Healey FP (1973) Inorganic nutrient uptake and deficiency in algae. *Crit Rev Microbiol* 3:69–113. doi: 10.3109/10408417309108746
- Healey FP, Hendzel LL (1979a) Fluorometric measurement of alkaline phosphatase activity in algae. *Freshw Biol* 9:429–439. doi: 10.1111/j.1365-2427.1979.tb01527.x
- Healey FP, Hendzel LL (1979b) Indicators of phosphorus and nitrogen deficiency in 5 algae in culture. *J Fish Res Board Canada* 36:1364–1369.
- Healey FP, Hendzel LL (1980) Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. *Can J Fish Aquat Sci* 37:442–453. doi: 10.1139/f80-058

- Heldal M, Scanlan DJ, Norland S, et al (2003) Elemental composition of single cells of various strains of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus* using X-ray microanalysis. *Limnol Oceanogr* 48:1732–1743.
- Hernandez I, Whitton BA (1996) Retention of p-nitrophenol and 4-methylumbelliferone by marine macroalgae and implications for measurement of alkaline phosphatase activity. *J Phycol* 32:819–825. doi: 10.1111/j.0022-3646.1996.00819.x
- Hoppe H-G (2003) Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia* 493:187–200. doi: 10.1023/A:1025453918247
- Hoppe H-G (1983) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: Measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar Ecol Prog Ser* 11:299–308. doi: 10.3354/meps011299
- Hoppe H-G (1993) Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria. In: Kemp PF, Sherr BF, Sheer EB, Cole JJ (eds) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, pp 423–431
- Hoppe H-G, Ullrich S (1999) Profiles of ectoenzymes in the Indian Ocean: Phenomena of phosphatase activity in the mesopelagic zone. *Aquat Microb Ecol* 19:139–148. doi: 10.3354/ame019139
- Hovind H, Magnusson B, Krysell M, et al (2011) *Interne Qualitätskontrolle; Handbuch für chemische Laboratorien*, 4th edn. Nordic Innovation Center
- Huang XL, Zhang JZ (2009) Neutral persulfate digestion at sub-boiling temperature in an oven for total dissolved phosphorus determination in natural waters. *Talanta* 78:1129–1135. doi: 10.1016/j.talanta.2009.01.029
- Hübener T, Kell V, Kolbow D, et al (1989) Dynamik des Phytoplanktons der Oberwarnow 1984 – 1986. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 17:619–631. doi: 10.1002/aheh.19890170604
- Ilikchyan IN, McKay RML, Zehr JP, et al (2009) Detection and expression of the phosphonate transporter gene *phnD* in marine and freshwater picocyanobacteria. *Environ Microbiol* 11:1314–1324. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01869.x
- Ivančić I, Pfannkuchen M, Godrijan J, et al (2016) Alkaline phosphatase activity related to phosphorus stress of microphytoplankton in different trophic conditions. *Prog Oceanogr* 146:175–186. doi: 10.1016/j.pocean.2016.07.003

- Jamet D, Amblard C, Devaux J (1997) Seasonal changes in alkaline phosphatase activity of bacteria and microalgae in Lake Pavin (Massif Central, France). *Hydrobiologia* 347:175–195. doi: 10.1023/A:1003044008455
- Jansson M (1976) Phosphatases in lake water: Characterization of enzymes from phytoplankton and zooplankton by gel filtration. *Science* 194(4262):320–321. doi: 10.1126/science.184531
- Jansson M, Olsson H, Broberg O (1981) Characterization of acid phosphatases in the acidified Lake Gardsjon, Sweden. *Arch für Hydrobiol* 92:377–395.
- Jansson M, Olsson H, Pettersson K (1988) Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia* 170:157–175. doi: 10.1007/BF00024903
- Jeong HJ, Yoo Y, Du, Kang NS, et al (2012) Heterotrophic feeding as a newly identified survival strategy of the dinoflagellate *Symbiodinium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12604–12609. doi: 10.1073/pnas.1204302109
- Johnson MD (2015) Inducible mixotrophy in the Dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J Eukaryot Microbiol* 62:431–443. doi: 10.1111/jeu.12198
- Jones JG (1972) Studies on freshwater microorganisms: Phosphatase activity in lakes of differing degrees of eutrophication. *J Ecol* 60:777–791. doi: 10.2307/2258564
- Kang W, Wang ZH, Liu L, Guo X (2019) Alkaline phosphatase activity in the phosphorus-limited southern Chinese coastal waters. *J Environ Sci (China)* 86:38–49. doi: 10.1016/j.jes.2019.04.026
- Karl DM (2014) Microbially mediated transformations of phosphorus in the sea: New views of an old cycle. *Ann Rev Mar Sci* 6:279–337. doi: 10.1146/annurev-marine-010213-135046
- Karl DM, Björkman KM (2014) Dynamics of dissolved organic phosphorus. In: *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, 2nd edn. Elsevier, pp 233–334
- Karner M, Herndl GJ (1992) Extracellular enzymatic activity and secondary production in free-living and marine-snow-associated bacteria. *Mar Biol* 113:341–347. doi: 10.1007/BF00347289
- Karsten U, Schumann R, Witte K (2003) Darß-Zingster Boddengewässer: Filter zwischen Land und See. *Biol unserer Zeit* 33:46–55. doi: 10.1002/biuz.200390008

- Koch MS, Kletou DC, Tursi R (2009) Alkaline phosphatase activity of water column fractions and seagrass in a tropical carbonate estuary, Florida Bay. *Estuar Coast Shelf Sci* 83:403–413. doi: 10.1016/j.ecss.2009.04.007
- Koch S, Kahle P, Lennartz B (2018) Spatio-temporal analysis of phosphorus concentrations in a North-Eastern German lowland watershed. *J Hydrol Reg Stud* 15:203–216. doi: 10.1016/j.ejrh.2018.02.001
- Kolowith LC, Ingall ED, Benner R (2001) Composition and cycling of marine organic phosphorus. *Limnol Ocean* 46:309–320.
- Kuenzler EJ, Perras JP (1965) Phosphatases of marine algae. *Biol Bull* 128:271–284.
- Labry C, Delmas D, Herbland A (2005) Phytoplankton and bacterial alkaline phosphatase activities in relation to phosphate and DOP availability within the Gironde plume waters (Bay of Biscay). *J Exp Mar Bio Ecol* 318:213–225. doi: 10.1016/j.jembe.2004.12.017
- Labry C, Delmas D, Youenou A, et al (2016) High alkaline phosphatase activity in phosphate replete waters: The case of two macrotidal estuaries. *Limnol Oceanogr* 61:1513–1529. doi: 10.1002/lno.10315
- Li H, Veldhuis MJW, Post AF (1998) Alkaline phosphatase activities among planktonic communities in the northern Red Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 173:107–115. doi: 10.3354/meps173107
- Li M, Shi X, Guo C, Lin S (2016) Phosphorus deficiency inhibits cell division but not growth in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Front Microbiol* 7:826. doi: 10.3389/fmicb.2016.00826
- Li WKW (1983) Consideration of errors in estimating kinetic parameters based on Michaelis-Menten formalism in microbial ecology. *Limnol Ocean* 28:185–190.
- Lien T, Knutsen G (1973) Synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*: Properties and regulation of repressible phosphatases. *Physiol Plant* 28:291–298. doi: 10.1111/j.1399-3054.1973.tb01191.x
- Lin H-Y, Shih C-Y, Liu H-C, et al (2013) Identification and characterization of an extracellular alkaline phosphatase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar Biotechnol* 15:425–436. doi: 10.1007/s10126-013-9494-3

- Lin S, Litaker RW, Sunda WG (2016) Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton. *J Phycol* 52:10–36. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Lin W, Zhao D, Luo J (2018) Distribution of alkaline phosphatase genes in cyanobacteria and the role of alkaline phosphatase on the acquisition of phosphorus from dissolved organic phosphorus for cyanobacterial growth. *J Appl Phycol* 30:839–850. doi: 10.1007/s10811-017-1267-3
- Lin X, Zhang H, Cui Y, Lin S (2012a) High sequence variability, diverse subcellular localizations, and ecological implications of alkaline phosphatase in dinoflagellates and other eukaryotic phytoplankton. *Front Microbiol* 3:235. doi: 10.3389/fmicb.2012.00235
- Lin X, Zhang H, Huang B, Lin S (2012b) Alkaline phosphatase gene sequence characteristics and transcriptional regulation by phosphate limitation in *Karenia brevis* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 17:14–24. doi: 10.1016/j.hal.2012.02.005
- Lomas MW, Bonachela JA, Levin SA, Martiny AC (2014) Impact of ocean phytoplankton diversity on phosphate uptake. *Proc Natl Acad Sci United States Am* 111:17540–17545. doi: 10.1073/pnas.1420760111
- LUNG (2013) Zur Entwicklung und zum Stand der Nährstoffbelastung der Küstengewässer Mecklenburg-Vorpommerns. *Berichte zur Gewässergüte*.
- Luo H, Benner R, Long RA, Hu J (2009) Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21219–21223. doi: 10.1073/pnas.0907586106
- Mahaffey C, Reynolds S, Davis CE, Lohan MC (2014) Alkaline phosphatase activity in the subtropical ocean: Insights from nutrient, dust and trace metal addition experiments. *Front Mar Sci* 1:13. doi: 10.3389/fmars.2014.00073
- Malcolm-Lawes DJ, Wong KH (1990) Determination of orthophosphate in waters and soils using a flow analyser. *Analyst* 115:65–67. doi: 10.1039/an9901500065
- Martin P, Dyhrman ST, Lomas MW, et al (2014) Accumulation and enhanced cycling of polyphosphate by Sargasso Sea plankton in response to low phosphorus. *Proc Natl Acad Sci* 111:8089–8094. doi: 10.1073/pnas.1321719111



- Martin P, Van Mooy BA, Heithoff A, Dyhrman ST (2011) Phosphorus supply drives rapid turnover of membrane phospholipids in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *ISME J* 5:1057–60. doi: 10.1038/ismej.2010.192
- Mateo P, Berrendero E, Perona E, et al (2010) Phosphatase activities of cyanobacteria as indicators of nutrient status in a Pyrenees river. *Hydrobiologia* 652:255–268. doi: 10.1007/s10750-010-0338-0
- McComb RB, Bowers GN, Posen S (1979) Alkaline phosphatases. Plenum Press, NY
- McLaughlin K, Sohm JA, Cutter GA, et al (2013) Phosphorus cycling in the Sargasso Sea: Investigation using the oxygen isotopic composition of phosphate, enzyme-labeled fluorescence, and turnover times. *Global Biogeochem Cycles* 27:375–387. doi: 10.1002/gbc.20037
- Møller EF (2007) Production of dissolved organic carbon by sloppy feeding in the copepods *Acartia tonsa*, *Centropages typicus*, and *Temora longicornis*. *Limnol Ocean* 52:79–84.
- Møller M, Mykkestad S, Haug A (1975) Alkaline and acid Phosphatases of the marine diatoms *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J Exp Mar Bio Ecol* 19:217–226.
- Moore LR, Ostrowski M, Scanlan DJ, et al (2005) Ecotypic variation in phosphorus-acquisition mechanisms within marine picocyanobacteria. *Aquat Microb Ecol* 39:257–269. doi: 10.3354/ame039257
- Mort HP, Slomp CP, Gustafsson BG, Andersen TJ (2010) Phosphorus recycling and burial in Baltic Sea sediments with contrasting redox conditions. *Geochim Cosmochim Acta* 74:1350–1362. doi: 10.1016/j.gca.2009.11.016
- Mouillon JM, Persson BL (2006) New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6:171–176. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00036.x
- Mühlenbruch M, Grossart HP, Eigemann F, Voss M (2018) Mini-review: Phytoplankton-derived polysaccharides in the marine environment and their interactions with heterotrophic bacteria. *Environ Microbiol* 20:2671–2685. doi: 10.1111/1462-2920.14302
- Müller K (2012) Phosphatlimitierung und Phosphataufnahme im Cyanobakterioplankton der Darß-Zingster Boddenkette. Diplomarbeit, Universität Rostock, MNF

- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27:31–36. doi: 10.1016/S0003-2670(00)88444-5
- Myklestad S, Sakshaug E (1983) Alkaline phosphatase activity of *Skeletonema costatum* populations in the Trondheimsfjord. *J Plankton Res* 5:557–564.
- Nagata T, Kirchman DL (1992) Release of macromolecular organic complexes by heterotrophic marine flagellates. *Mar Ecol Prog Ser* 83:233–240.
- Nagul EA, McKelvie ID, Worsfold P, Kolev SD (2015) The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Anal Chim Acta* 890:60–82. doi: 10.1016/j.aca.2015.07.030
- Nausch G (2011) Meeresverschmutzung und Meeresschutz; Eutrophierung der Ostsee. *Chemie Unserer Zeit* 45:164–170. doi: 10.1002/ciuz.201100537
- Nausch M (1998) Alkaline phosphatase activities and the relationship to inorganic phosphate in the Pomeranian Bight (southern Baltic Sea). *Aquat Microb Ecol* 16:87–94.
- NC-IUBMB Nomenclature Committee of the international union of biochemistry and molecular biology - Enzyme nomenclature.
- Nedoma J, Štrojsová A, Vrba J, et al (2003) Extracellular phosphatase activity of natural plankton studied with ELF97 phosphate: Fluorescence quantification and labelling kinetics. *Environ Microbiol* 5:462–472. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00431.x
- Nicholson D, Dyhrman S, Chavez F, Paytan A (2006) Alkaline phosphatase activity in the phytoplankton communities of Monterey Bay and San Francisco Bay. *Limnol Ocean* 51:874–883.
- Olsson H (1983) Origin and production of phosphatases in the acid Lake Gårdsjön. *Hydrobiologia* 101:49–58. doi: 10.1007/BF00008656
- Patni NJ, Aaronson S, Holik KJ, Davis RH (1974) Existence of acid and alkaline phosphohydrolase activity in the phytoflagellate *Ochromonas danica*. *Arch Microbiol* 97:63–67. doi: 10.1007/BF00403045
- Paytan A, McLaughlin K (2007) The oceanic phosphorus cycle. *Chem Rev* 107:563–76. doi: 10.1021/cr0503613

- Perry MJ (1972) Alkaline phosphatase activity in subtropical Central North Pacific waters using a sensitive fluorometric method. *Mar Biol* 15:113–119. doi: 10.1007/BF00353639
- Perry MJ (1976) Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus-limited chemostat culture and in the oligotrophic waters of the central North Pacific. *Limnol Oceanogr* 21:88–107. doi: 10.4319/lo.1976.21.1.0088
- Pettersson K (1980) Alkaline phosphatase activity and algal surplus phosphorus as phosphorus-deficiency indicators in Lake Erken. *Arch für Hydrobiol* 89:54–87.
- Pick FR (1987) Interpretations of alkaline phosphatase activity in Lake Ontario. *Can J Fish Aquat Sci* 44:2087–2094. doi: 10.1139/ f87-258
- Quisel JD, Wykoff DD, Grossman AR (1996) Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 111:839–848. doi: 111/3/839 [pii]
- Ray JM, Bhaya D, Block MA, Grossman AR (1991) Isolation, transcription, and inactivation of the gene for an atypical alkaline phosphatase of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 173:4297–4309. doi: 10.1128/jb.173.14.4297-4309.1991
- Redfield AC (1934) On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. In: Daniel RJ (ed) *James Johnstone Memorial Volume*. Liverpool University press, pp 176–192
- Reichardt W (1971) Catalytic mobilization of phosphate in lake water and by Cyanophyta. *Hydrobiologia* 38:377–394. doi: 10.1007/BF00036544
- Reichardt W, Overbeck J, Steubing L (1967) Free dissolved enzymes in lake waters. *Nature* 216:1345–1347. doi: 10.1038/2161345a0
- Rengefors K, Pettersson K, Blenckner T, Anderson DM (2001) Species-specific alkaline phosphatase activity in freshwater spring phytoplankton: Application of a novel method. *J Plankton Res* 23:435–443. doi: 10.1093/plankt/23.4.435
- Rivkin RB, Swift E (1980) Characterization of alkaline phosphatase and organic phosphorous utilization in the oceanic dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca*. *Mar Biol* 61:1–8. doi: 10.1007/BF00410336

- Rose C, Axler RP (1998) Uses of alkaline phosphatase activity in evaluating phytoplankton community phosphorus deficiency. *Hydrobiologia* 361:145–156. doi: 10.1023/A:1003178502883
- Sala MM, Karner M, Arin L, Marrasé C (2001) Measurement of ectoenzyme activities as an indication of inorganic nutrient imbalance in microbial communities. *Aquat Microb Ecol* 23:301–311. doi: 10.3354/ame023301
- Schiewer U (1998) 30 years eutrophication in shallow brackish waters - lessons to be learned. *Hydrobiologia* 363:73–79.
- Schlunbaum G, Baudler H (2001) Wasserhaushalt und Salzgehaltsverhältnisse in den Bodden - ein Vergleich mit anderen Küstengewässern. In: Benke H (ed) *Meer und Museum, Schriftenreihe des Deutschen Meeresmuseums*, 16th edn. pp 17–24
- Schlunbaum G, Baudler H, Krech M (2001) Das Eutrophierungsproblem der Darß-Zingster Bodden - Nährstoffeinträge und Nährstoffbilanzen. In: Benke H (ed) *Meer und Museum, Schriftenreihe des Deutschen Meeresmuseums*, 16th edn. pp 25–34
- Schumann R, Karsten U (2006) Phytoplankton im Zingster Strom der Darß-Zingster Boddenkette – 13 Jahre Remesotrophierung. *Rostocker Meeresbiologische Beiträge* 16:47–59.
- Schumann R, Rentsch D, Görs S, Schiewer U (2001) Seston particles along a eutrophication gradient in coastal waters of the southern Baltic Sea: Significance of detritus and transparent mucoid material. *Mar Ecol Prog Ser* 218:17–31. doi: 10.3354/meps218017
- Schumann R, Schoor A, Schubert H (2009) Fine resolution of primary production and its limitation in phytoplankton communities of the Darss-Zingst Bodden Chain, a coastal lagoon of the southern Baltic Sea. *Balt Coast Zo* 97–125.
- Sebastián M, Arístegui J, Montero MF, Niell FX (2004) Kinetics of alkaline phosphatase activity, and effect of phosphate enrichment: a case study in the NW African upwelling region. *Mar Ecol Prog Ser* 270:1–13. doi: 10.2307/24867396
- Sebastián M, Niell FX (2004) Alkaline phosphatase activity in marine oligotrophic environments: Implications of single-substrate addition assays for potential activity estimations. *Mar Ecol Prog Ser* 277:285–290. doi: 10.3354/meps277285

- Senjarini K, Karsten U, Schumann R (2008) Are bacteria the main producers of hydrolytic enzymes in aquatic environment? *J ILMU DASAR* 9:28–37.
- Simpson RT, Vallee BL (1970) Negative homotropic interactions in binding of substrate to alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 9:953–958. doi: 10.1021/bi00806a035
- Siuda W, Chrost RJ (1987) The relationship between alkaline phosphatase (APA) activity and phosphate availability for phytoplankton and bacteria in eutrophic lakes. *Acta Microbiol Pol* 36:247–257.
- Smith REH, Kalff J (1982) Size-dependent phosphorus uptake kinetics and cell quota in phytoplankton. *J Phycol* 18:275–284. doi: 10.1111/j.1529-8817.1982.tb03184.x
- Stewart AJ, Wetzel RG (1982) Phytoplankton contribution to alkaline phosphatase activity. *Arch für Hydrobiol* 93:265–271.
- Štrojsová A, Vrba J (2009) Short-term variation in extracellular phosphatase activity: Possible limitations for diagnosis of nutrient status in particular algal populations. *Aquat Ecol* 43:19–25. doi: 10.1007/s10452-007-9154-7
- Štrojsová A, Vrba J, Nedoma J, et al (2003) Seasonal study of extracellular phosphatase expression in the phytoplankton of a eutrophic reservoir. *Eur J Phycol* 38:295–306. doi: 10.1080/09670260310001612628
- Suttle CA, Cochlan WP, Stockner JG (1991) Size-dependent ammonium and phosphate uptake, and N:P supply ratios in an oligotrophic lake. *Can J Fish Aquat Sci* 48:1226–1234.
- Taga N, Kobori H (1978) Phosphatase activity in eutrophic Tokyo Bay. *Mar Biol* 49:223–229. doi: 10.1007/BF00391134
- Tarapchak SJ, Bigelow SM, Rubitschun C (1982) Overestimation of orthophosphorus concentrations in surface waters of southern Lake Michigan: Effects of acid and ammonium molybdate. *Can J Fish Aquat Sci* 39:296–304. doi: 10.1139/f82-041
- Tipping E, Benham S, Boyle JF, et al (2014) Atmospheric deposition of phosphorus to land and freshwater. *Environ Sci Process Impacts* 16:1608–1617. doi: 10.1039/C3EM00641G
- Van Mooy BAS, Fredricks HF, Pedler BE, et al (2009) Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature* 458:69–72. doi: 10.1038/nature07659

- Van Mooy BAS, Krupke A, Dyhrman ST, et al (2015) Major role of planktonic phosphate reduction in the marine phosphorus redox cycle. *Science* 348(6236):783–786.
- Van Mooy BAS, Rocap G, Fredricks HF, et al (2006) Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proc Natl Acad Sci* 103:8607–8612. doi: 10.1073/pnas.0600540103
- Van Wambeke F, Nedoma J, Duhamel S, Lebaron P (2008) Alkaline phosphatase activity of marine bacteria studied with ELF 97 substrate: Success and limits in the P-limited Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* 52:245–251. doi: 10.3354/ame01238
- Vidal M, Duarte CM, Agustí S, et al (2003) Alkaline phosphatase activities in the central Atlantic Ocean indicate large areas with phosphorus deficiency. *Mar Ecol Prog Ser* 262:43–53. doi: 10.3354/meps262043
- Voß B, Bolhuis H, Fewer DP, et al (2013) Insights into the physiology and ecology of the brackish-water-adapted cyanobacterium *Nodularia spumigena* CCY9414 based on a genome-transcriptome analysis. *PLoS One* 8:e60224. doi: 10.1371/journal.pone.0060224
- Vrba J, Vyhnálek V, Hejzlar J, Nedoma J (1995) Comparison of phosphorus deficiency indices during a spring phytoplankton bloom in a eutrophic reservoir. *Freshw Biol* 33:73–81. doi: 10.1111/j.1365-2427.1995.tb00387.x
- Wang Z hui, Liang Y, Kang W (2011) Utilization of dissolved organic phosphorus by different groups of phytoplankton taxa. *Harmful Algae* 12:113–118. doi: 10.1016/j.hal.2011.09.005
- Wasmund N, Dutz J, Pollehne F, et al (2017) Biological assessment of the Baltic Sea 2016.
- Wasmund N, Dutz J, Pollehne F, et al (2014) Biological assessment of the Baltic Sea 2013.
- Wasmund N, Pollehne F, Postel L, et al (2004) Biological assessment of the Baltic Sea 2003.
- Wetzel RG (1981) Longterm dissolved and particulate alkaline phosphatase activity in a hardwater lake in relation to lake stability and phosphorus enrichments. *Int Vereinigung für Theor und Angew Limnol* 21:369–381. doi: 10.1080/03680770.1980.11897009
- White AE (2009) New insights into bacterial acquisition of phosphorus in the surface ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21013–21014. doi: 10.1073/pnas.0912475107

- Whitton BA, Al-Sheri AH, Ellwood NTW, Turner BL (2005) Ecological aspects of phosphatase activity in cyanobacteria, eukaryotic algae and bryophytes. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin D (eds) *Organic Phosphorus in the Environment*. Commonwealth Agricultural Bureau, pp 205–241
- Whitton BA, Grainger SLJ, Hawley GRW, Simon JW (1991) Cell-bound and extracellular phosphatase activities of cyanobacterial isolates. *Microb Ecol* 21:85–98. doi: 10.1007/BF02539146
- Wynne D (1977) Alterations in activity of phosphatases during the *Peridinium* bloom in lake Kinneret. *Physiol Plant* 40:219–224. doi: 10.1111/j.1399-3054.1977.tb04060.x
- Xu Y, Boucher JM, Morel FMM (2010) Expression and diversity of alkaline phosphatase *ehp1* in *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *J Phycol* 46:85–92. doi: 10.1111/j.1529-8817.2009.00788.x
- Xu Y, Wahlund TM, Feng L, et al (2006) A novel alkaline phosphatase in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) and its regulation by phosphorus. *J Phycol* 42:835–844. doi: 10.1111/j.1529-8817.2006.00243.x
- Young CL, Ingall ED (2010) Marine dissolved organic phosphorus composition: Insights from samples recovered using combined electrodialysis/reverse osmosis. *Aquat Geochemistry* 16:563–574. doi: 10.1007/s10498-009-9087-y

## Anhang

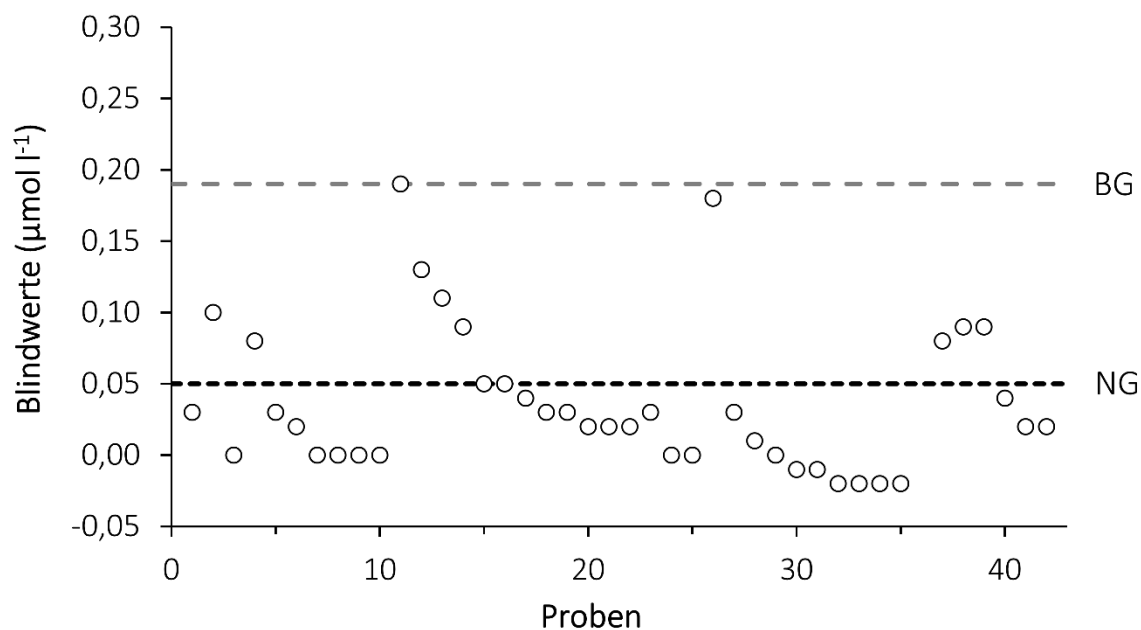


Abb. A1: Blindwert-Zielkarte für die Messung des gelösten anorganischen Phosphorgehalts (DIP-Gehalt;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ;  $n = 42$ ); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Nachweisgrenze (NG; 0,05  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) und die grau gestrichelte Linie die Bestimmungsgrenze (BG; 0,19  $\mu\text{mol l}^{-1}$ )

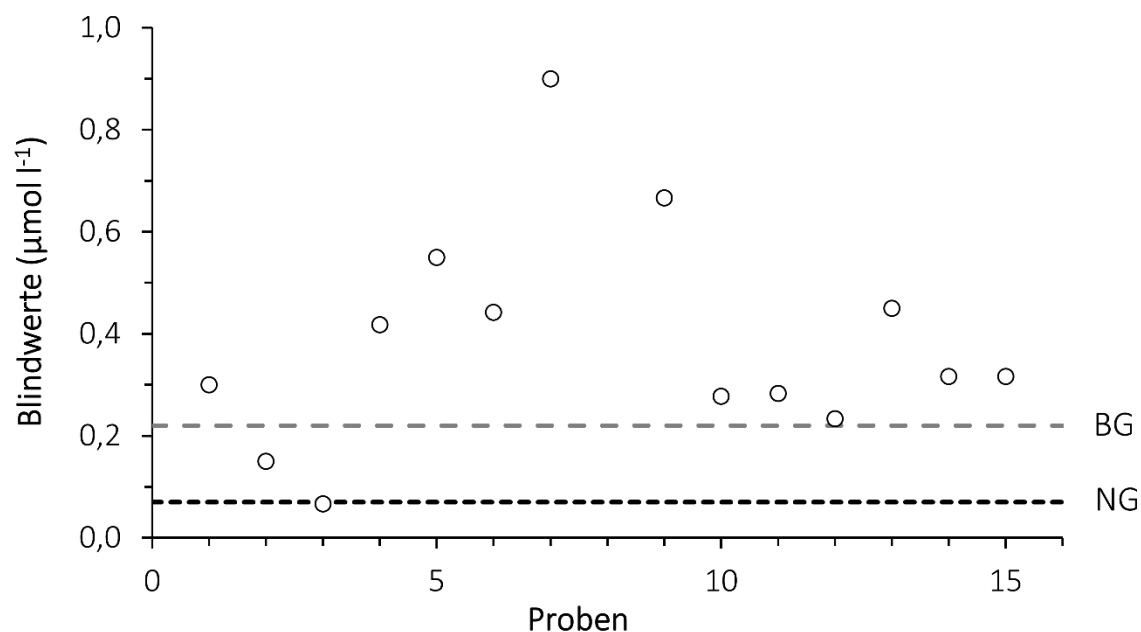


Abb. A2: Blindwert-Zielkarte der Messung des Gesamtposphorgehalts (TP-Gehalt;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ;  $n = 15$ ) und des gelösten Phosphorgehalts (DP-Gehalt;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ;  $n = 15$ ); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Nachweisgrenze (NG; 0,07  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) und die grau gestrichelte Linie die Bestimmungsgrenze (BG; 0,22  $\mu\text{mol l}^{-1}$ )



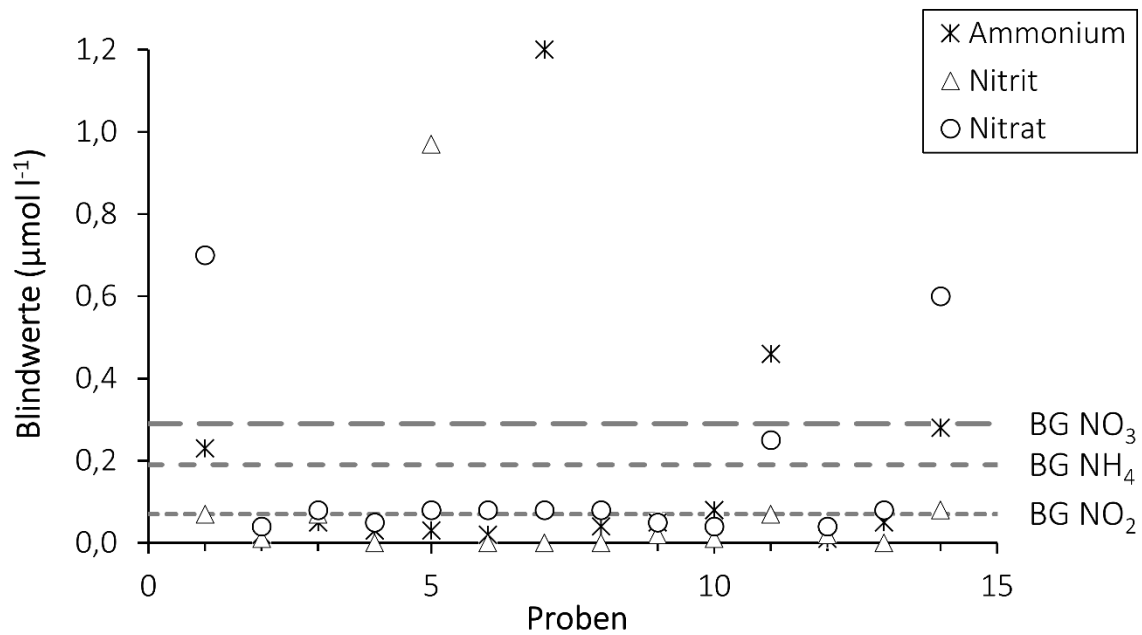


Abb. A3: Blindwert-Zielkarte der Messungen des Ammonium- ( $\text{NH}_4$ -Gehalt;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ;  $n = 7$ ), Nitrit- ( $\text{NO}_2$ -Gehalt;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ;  $n = 7$ ) und Nitratgehalts ( $\text{NO}_3$ -Gehalt;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ;  $n = 7$ ); Die gestrichelten Linien markieren die jeweiligen Bestimmungsgrenzen (BG) von Ammonium ( $0,19 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), Nitrit ( $0,07 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) und Nitrat ( $0,29 \mu\text{mol l}^{-1}$ )

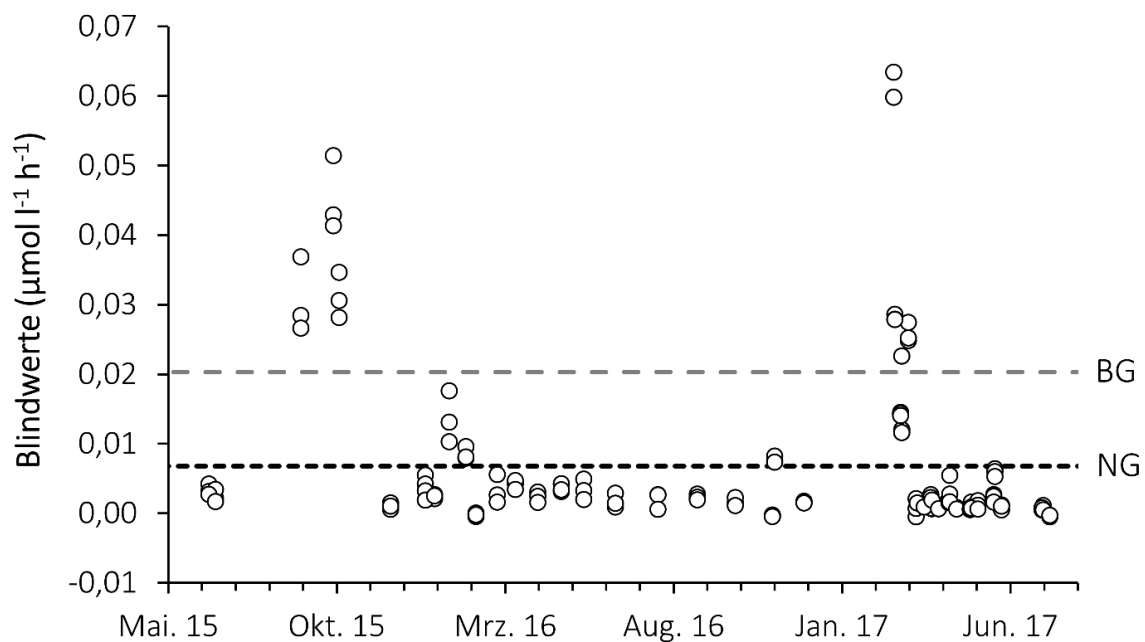


Abb. A4: Blindwert-Zielkarte der Messung der alkalinen Phosphataseaktivität (AlkPA;  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ;  $n = 49$ ); Gezeigt sind die drei höchsten Blindwerte pro Messung; Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Nachweisgrenze (NG;  $0,007 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), die grau gestrichelte Linie die Bestimmungsgrenze (BG;  $0,02 \mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

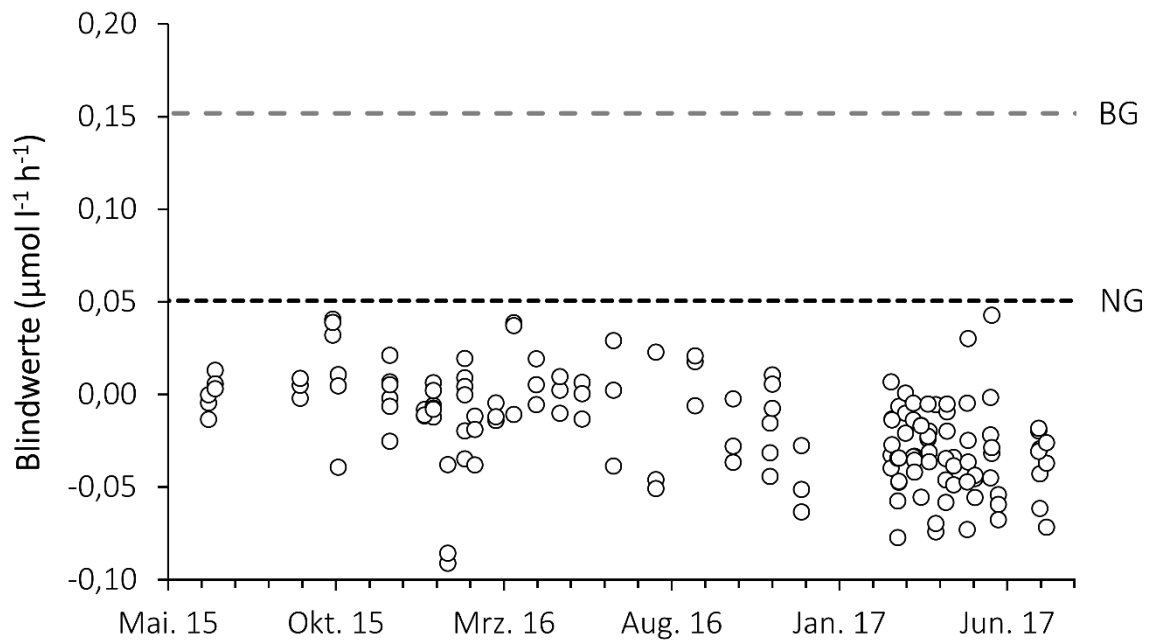


Abb. A5: Blindwert-Zielkarte der Messung der Aminopeptidaseaktivität (PepA;  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ;  $n = 49$ ); Gezeigt sind die drei höchsten Blindwerte einer jeden-Messung; Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Nachweisgrenze (NG; 0,05  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) und die grau gestrichelte Linie die Bestimmungsgrenze (BG; 0,15  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

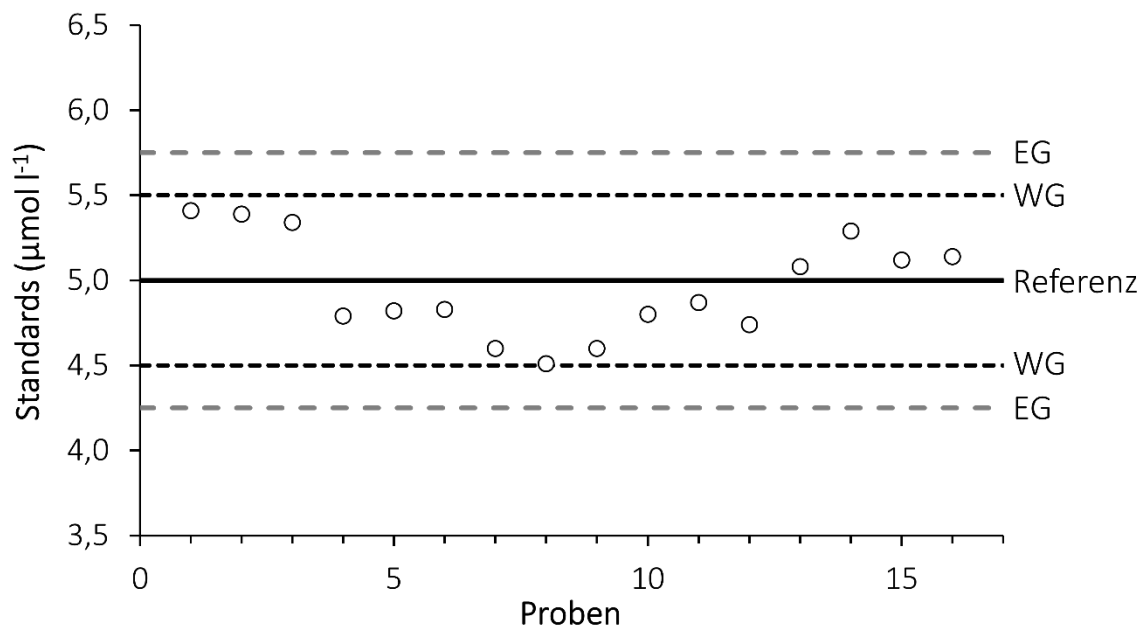


Abb. A6: Sollwert-Zielkarte des Standards Kaliumhydrogenphosphat (5  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ;  $n = 16$ ) für die Messung des gelösten anorganischen Phosphorgehalts (DIP-Gehalt); Die schwarze Linie markiert den Referenzwert, die schwarz gestrichelten Linien die Warngrenzen (WG;  $\pm 10\%$ ) und die grau gestrichelten Linien die Eingriffsgrenzen (EG;  $\pm 15\%$ )

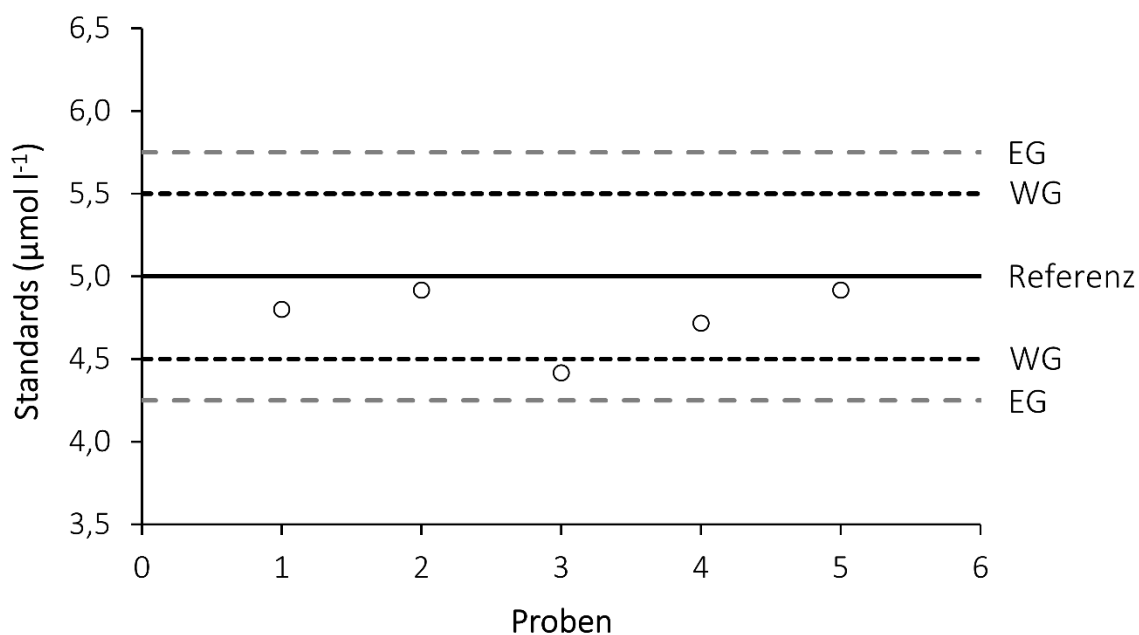


Abb. A7: Sollwert-Zielkarte des Standards Diphenylphosphat ( $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ ;  $n = 5$ ) der Messung des Gesamtposphorgehalts (TP-Gehalt) und des gelösten Phosphorgehalts (DP-Gehalt); Die schwarze Linie markiert den Referenzwert, die schwarz gestrichelten Linien die Warn Grenzen (WG;  $\pm 10\%$ ) und die grau gestrichelten Linien die Eingriffsgrenzen (EG;  $\pm 15\%$ )

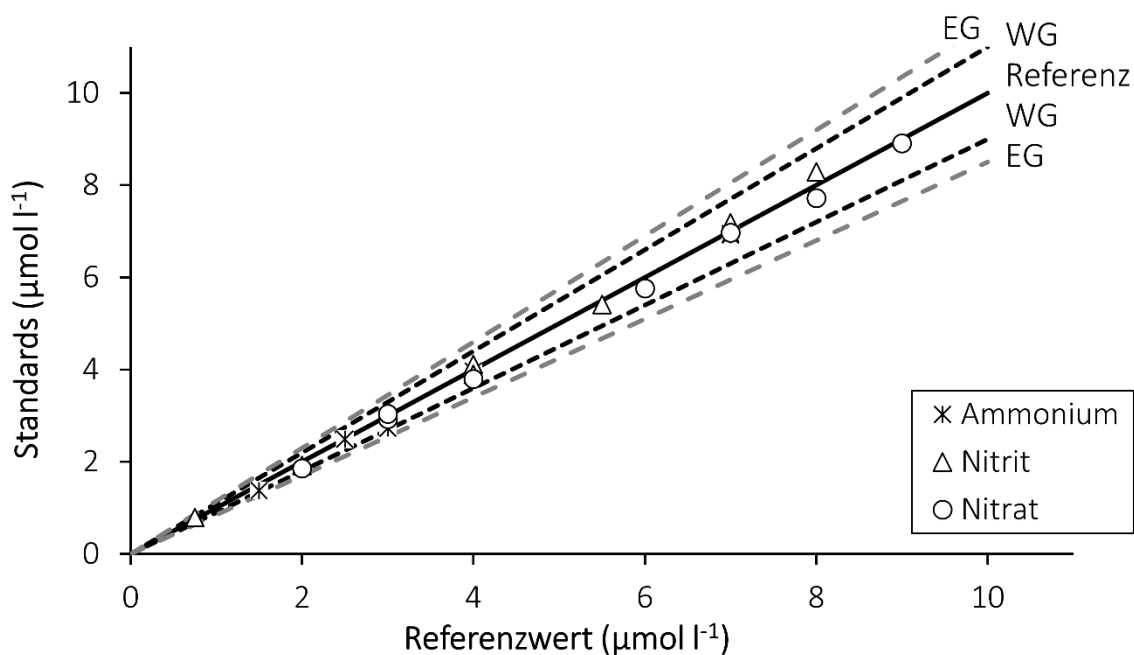


Abb. A8: Sollwert-Zielkarte der Standards Ammoniumchlorid ( $n = 6$ ) und Natriumnitrit ( $n = 8$ ) in verschiedenen Konzentrationen für die Messungen des Ammonium-, Nitrit- und Nitratgehalts; Die schwarze Linie markiert den Referenzwert, die schwarz gestrichelten Linien die Warn Grenzen (WG;  $\pm 10\%$ ) und die grau gestrichelten Linien die Eingriffsgrenzen (EG;  $\pm 15\%$ )

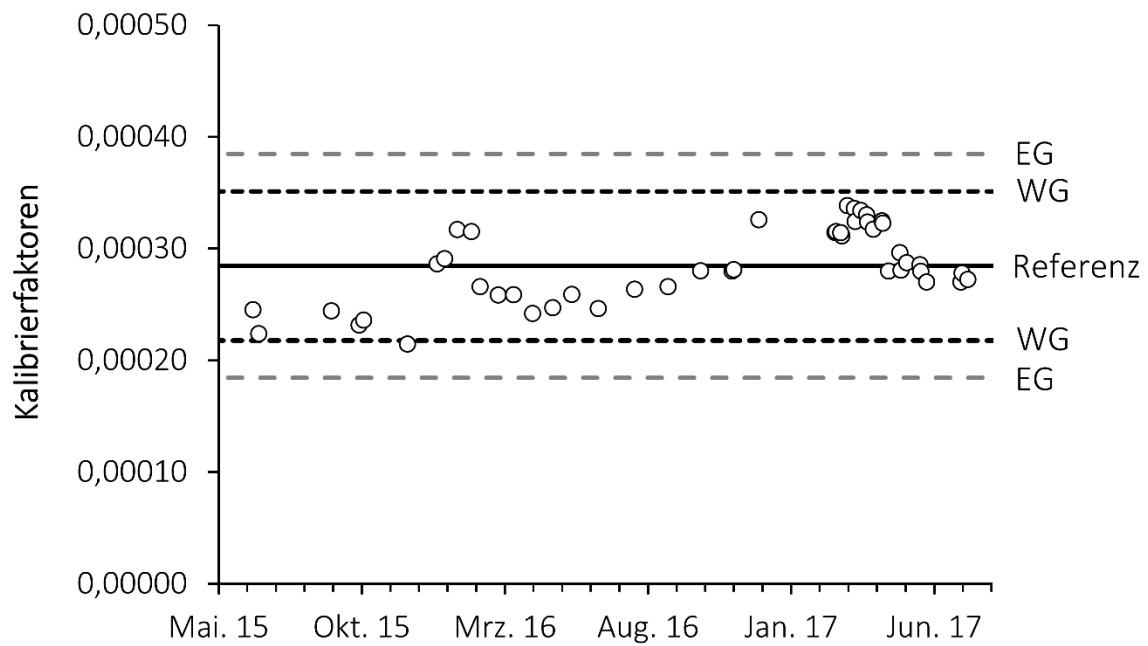


Abb. A9: Regelkarte für die Kalibrierfaktoren der Messung des Substrats Methylumbelliferon (MUF; n = 46); Die schwarz durchgezogene Linie markiert den Referenzwert, die schwarz gestrichelten Linien die Warngrenzen (WG) und die grau gestrichelten Linien die Eingriffsgrenzen (EG)

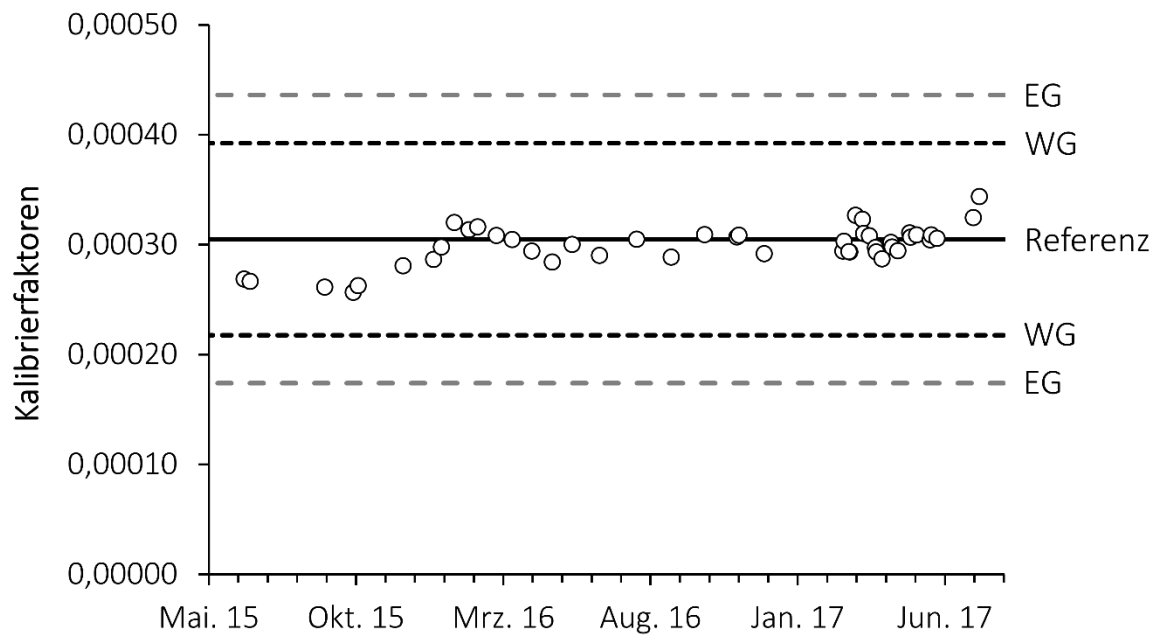


Abb. A10: Regelkarte für die Kalibrierfaktoren der Messung des Substrats 7-Amino-4-methylcumarin (AMC; n = 46); Die schwarz durchgezogene Linie markiert den Referenzwert, die schwarz gestrichelten Linien die Warngrenzen (WG) und die grau gestrichelten Linien die Eingriffsgrenzen (EG)

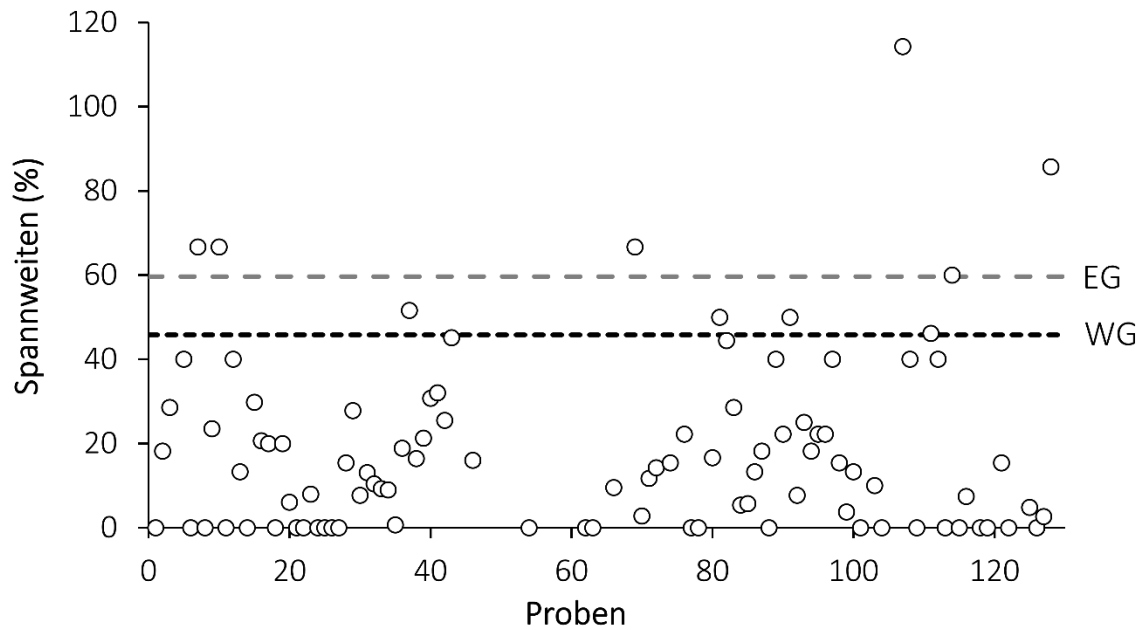


Abb. A11: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) für die Messung des gelösten anorganischen Phosphorgehalts (DIP-Gehalt;  $n = 129$ ); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

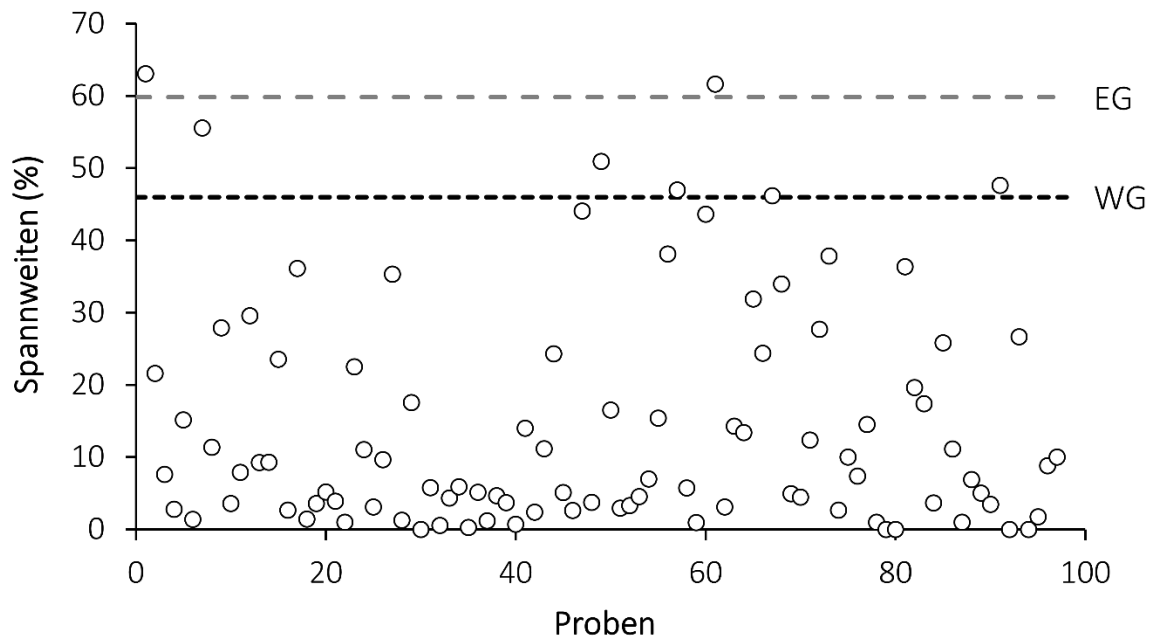


Abb. A12: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung des Gesamtphosphorgehalts (TP-Gehalt;  $n = 97$ ) und des gelösten Phosphorgehalts (DP-Gehalt;  $n = 97$ ); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

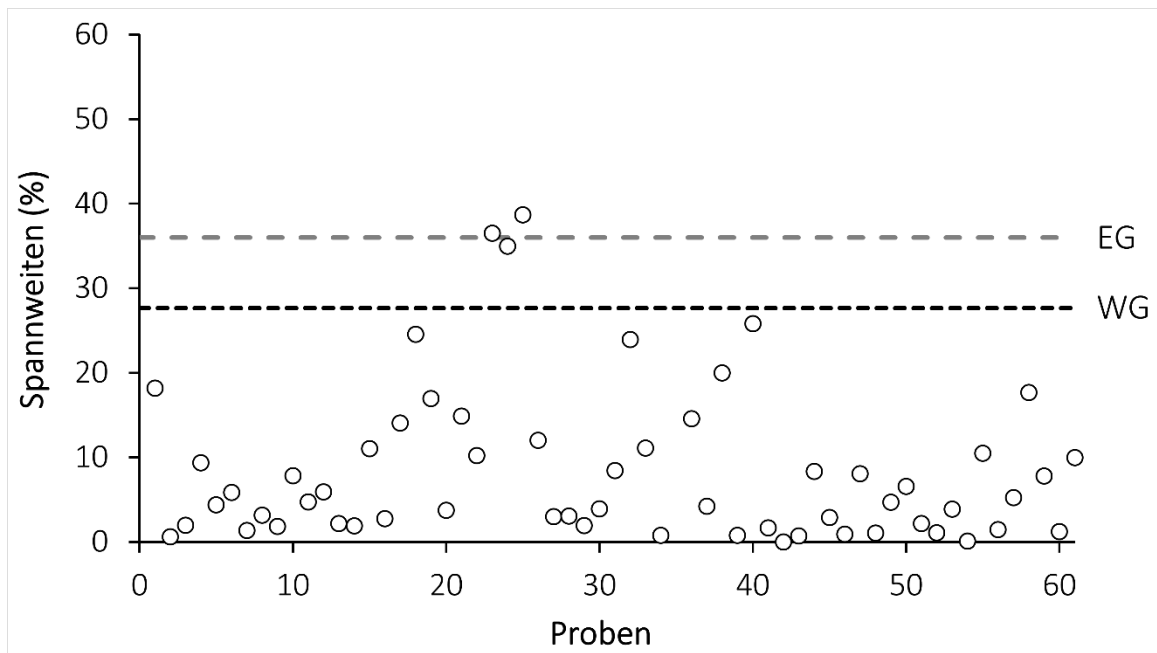


Abb. A13: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung des Ammoniumgehalts (n = 61); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

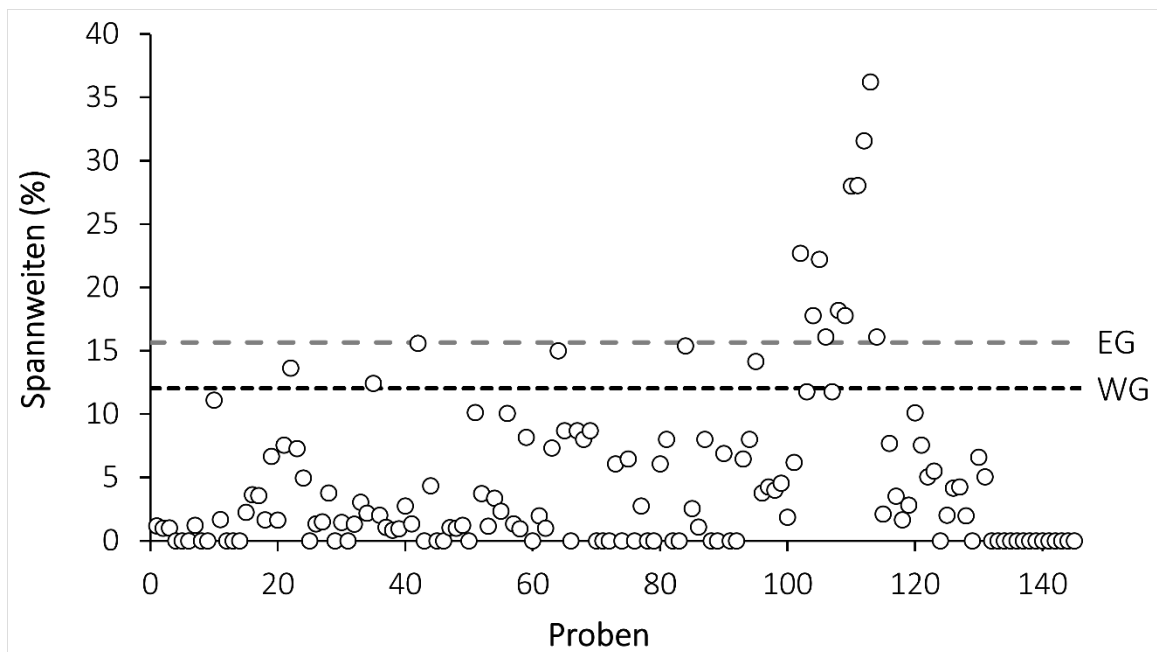


Abb. A14: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung des Nitritgehalts (n = 145); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

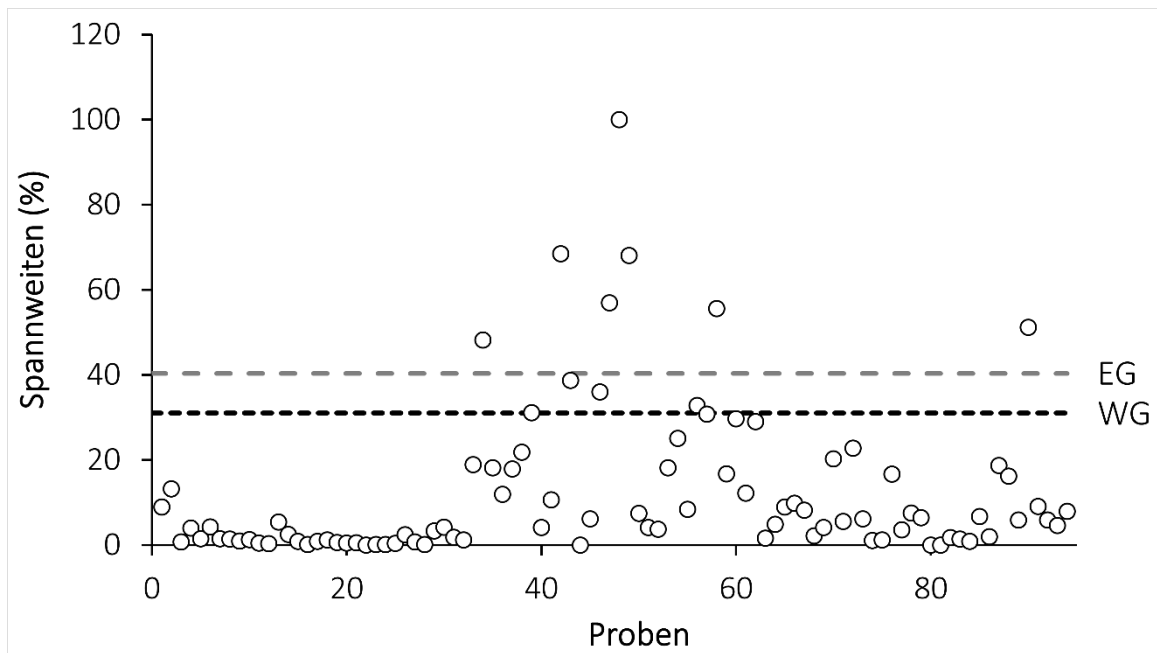


Abb. A15: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung des Nitratgehalts (n = 145); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

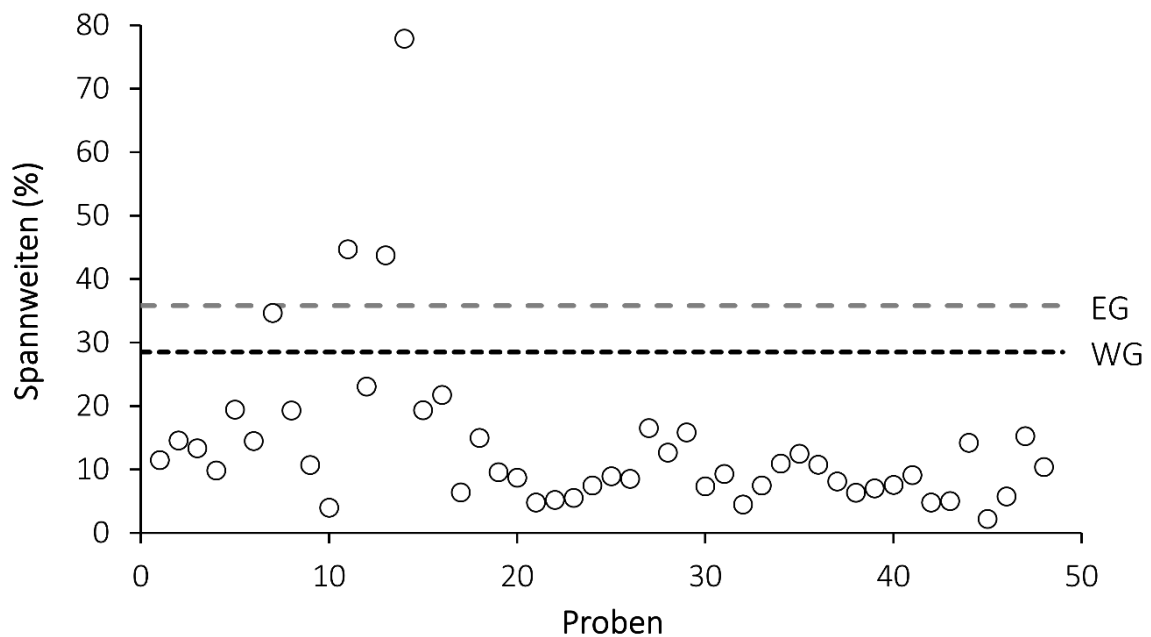


Abb. A16: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung der alkalinen Phosphataseaktivität (AlkPA; n = 48); Gezeigt sind die Spannweiten der Vollprobe bei der höchsten Substratkonzentration. Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

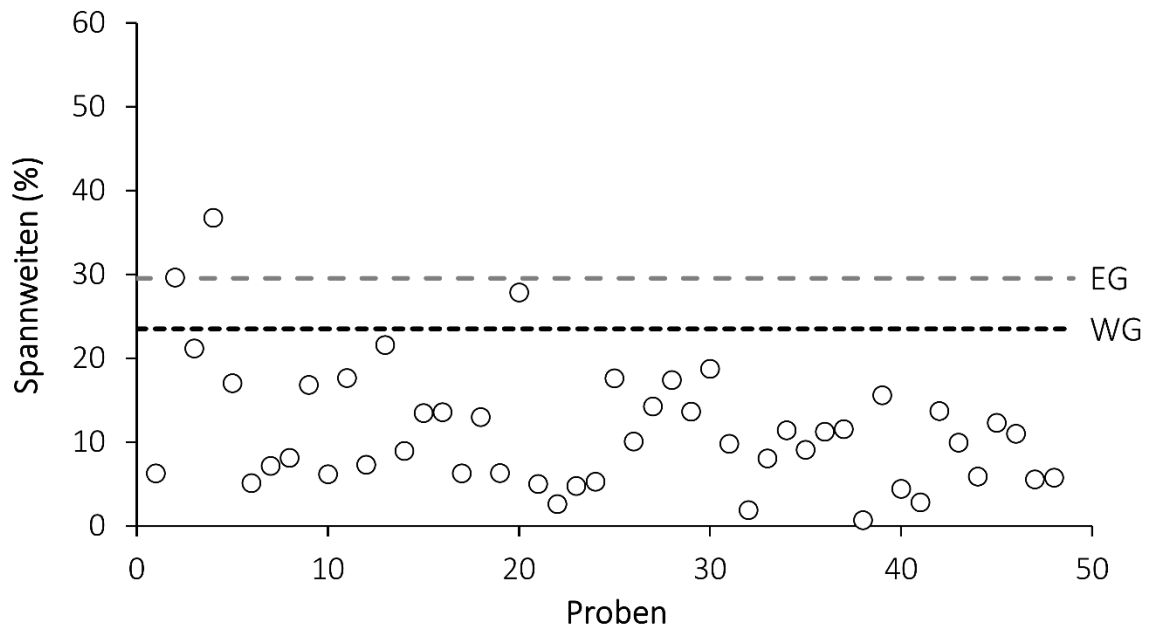


Abb. A17: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung der Aminopeptidaseaktivität (PepA; n = 48); Gezeigt sind die Spannweiten der Vollproben. Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

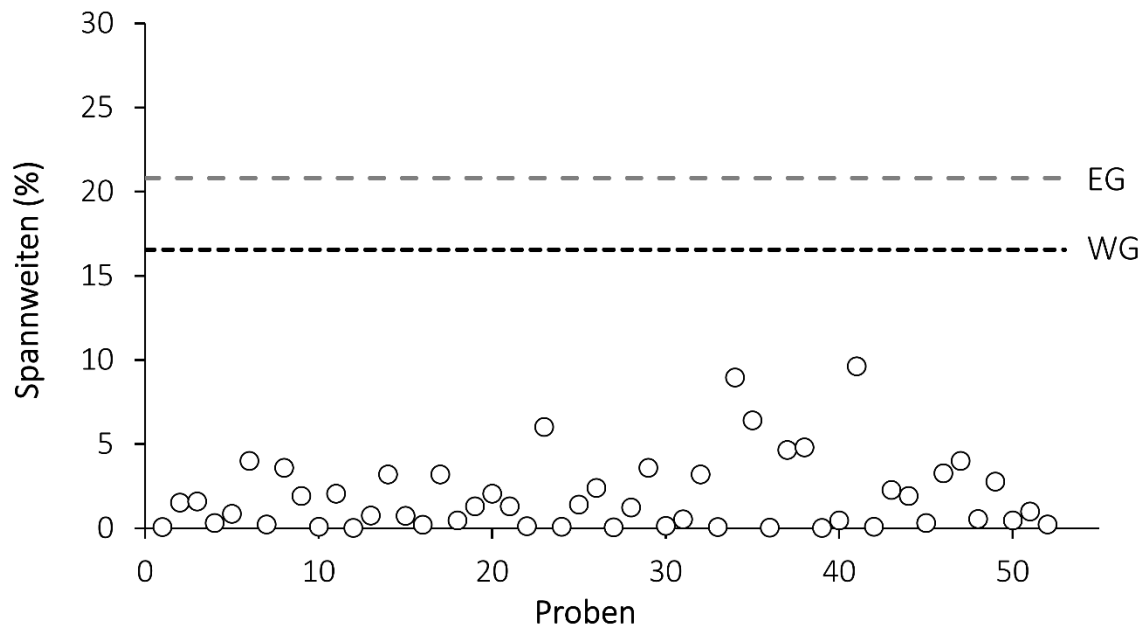


Abb. A18: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung des Chlorophyll  $a$ -Gehalts (Chl  $a$ -Gehalt; n = 52); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)



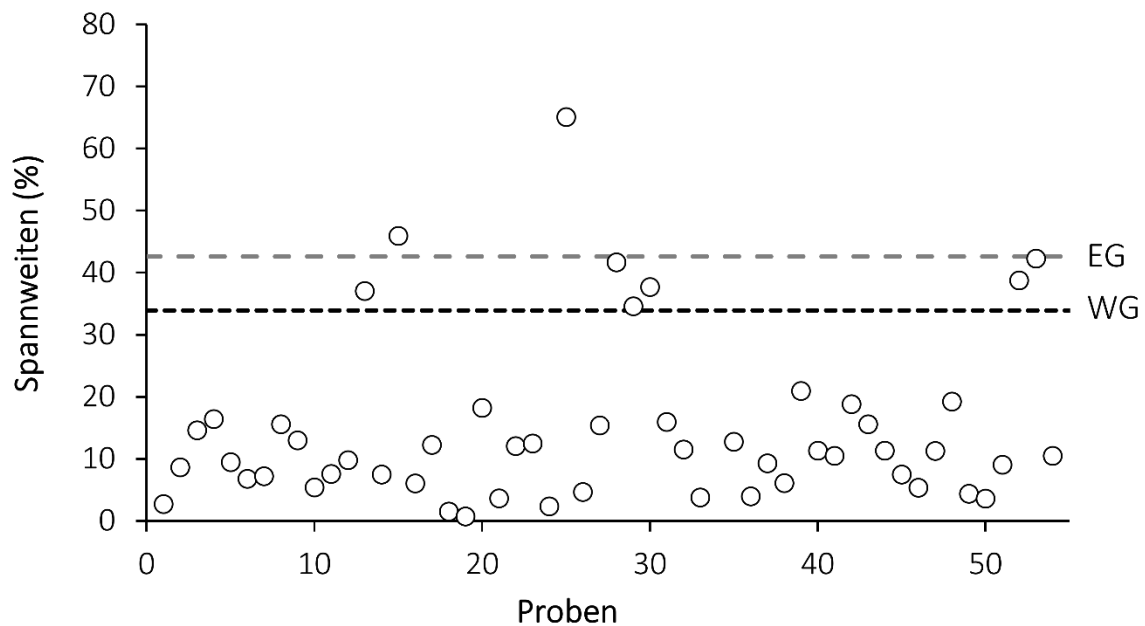


Abb. A19: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung des Sestongehalts (n = 54); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

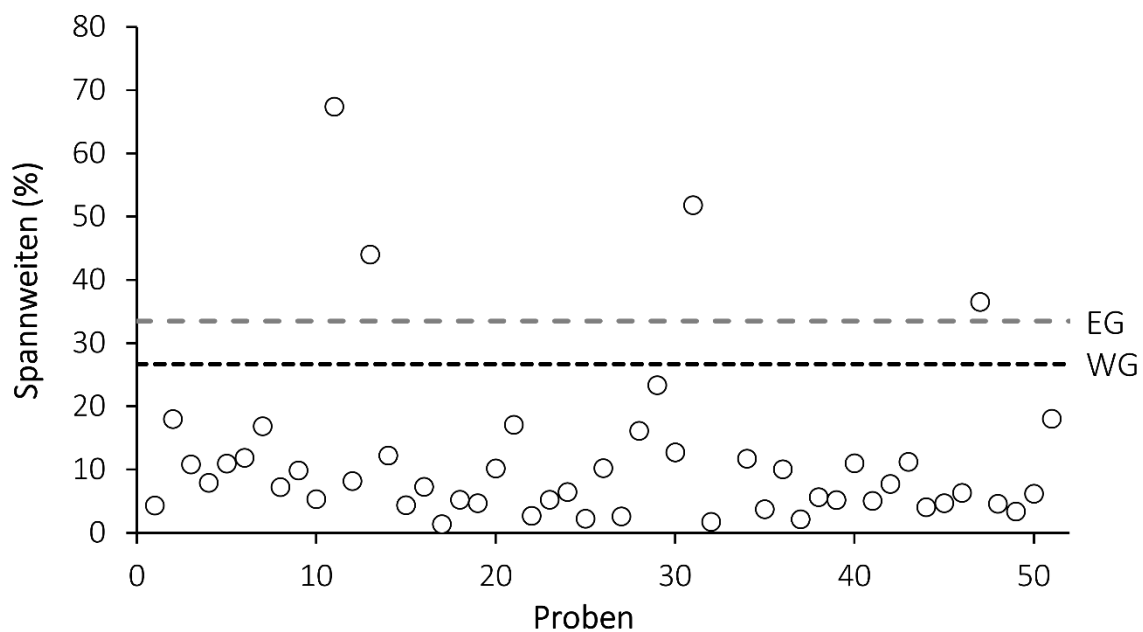


Abb. A20: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung des Gehalts an partikulärem organischem Material (POM-Gehalt; n = 51); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

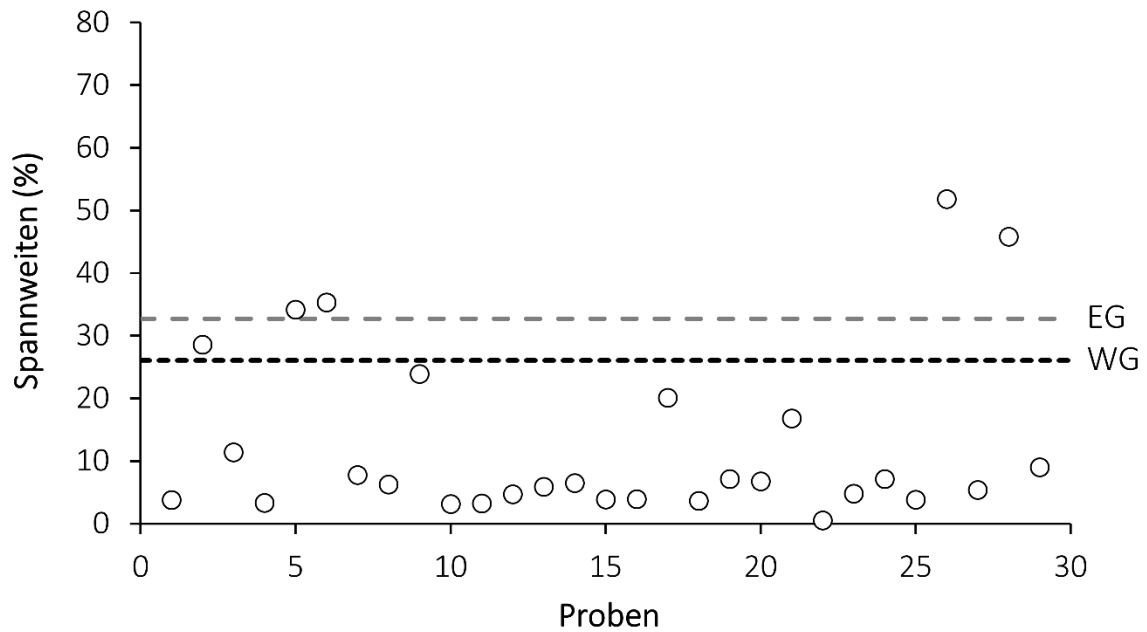


Abb. A21: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung des partikulären organischen Kohlenstoffgehalts (POC-Gehalt; n = 29); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

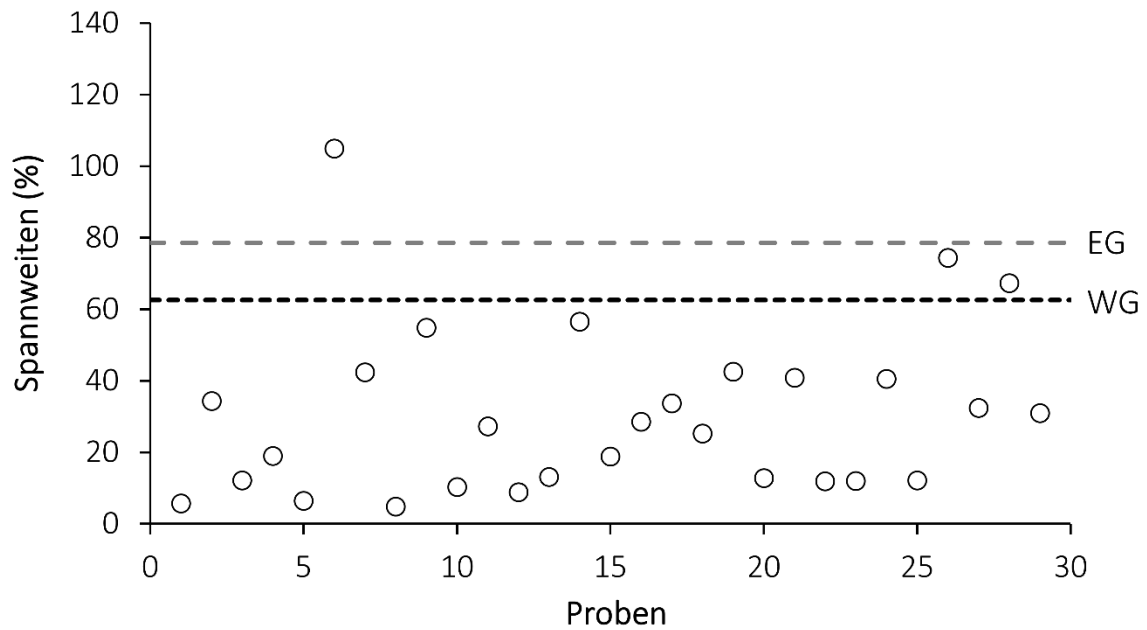


Abb. A22: Spannweiten-Regelkarte (% vom Mittelwert) der Messung des partikulären Stickstoffgehalts (PN-Gehalt; n = 29); Die schwarz gestrichelte Linie markiert die Warngrenze (WG) und die grau gestrichelte Linie die Eingriffsgrenze (EG)

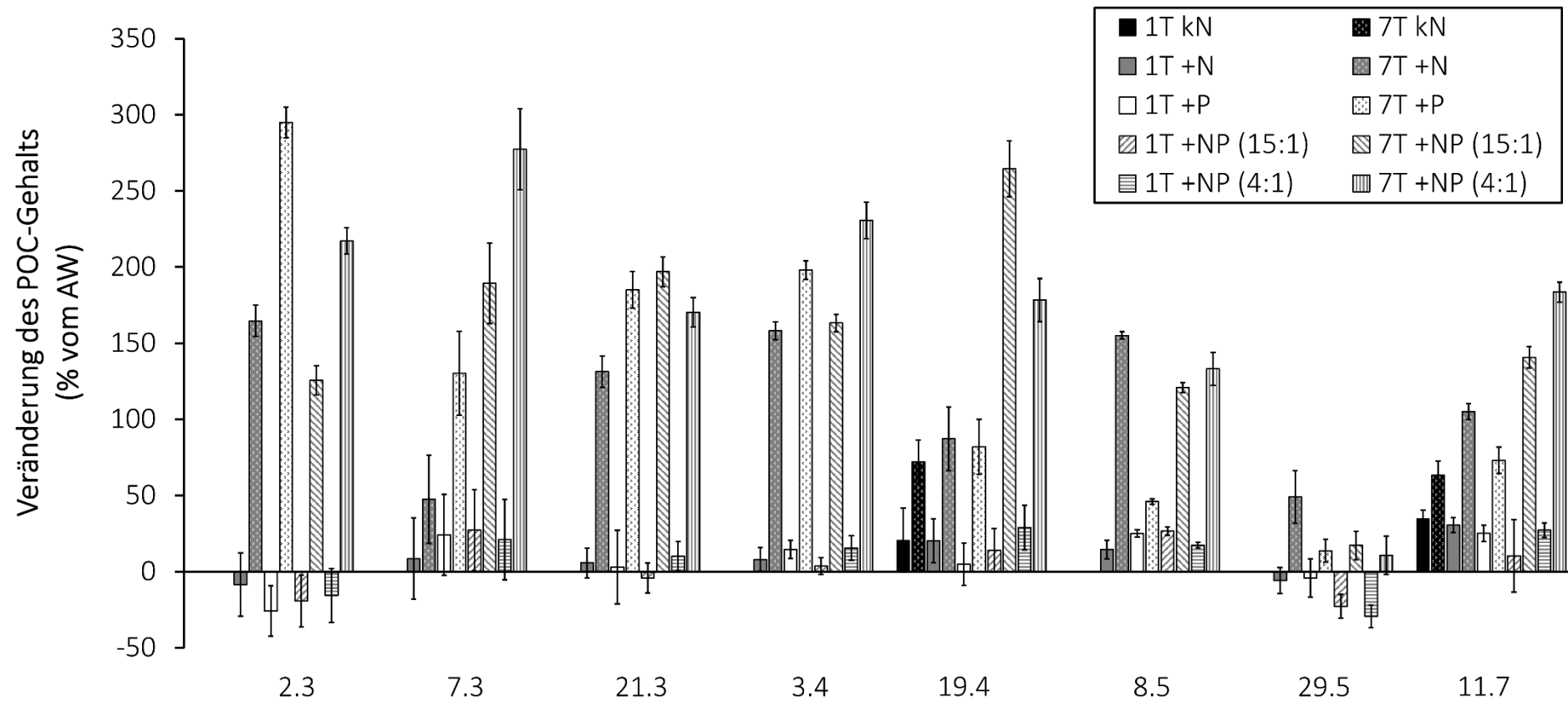


Abb. A23: Die Veränderung des partikulären organischen Kohlenstoffgehalts (POC-Gehalt) in natürlichen Zingster Strom-Proben (Frühjahr bis Sommer 2017) nach der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen, angegeben in Prozent vom Ausgangswert (AW) nach 24 Stunden (1T) und nach sieben Tagen (7T); kN = keine Nährstoffzugabe; +N = Zugabe von  $75\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$ ; +P = Zugabe von  $5\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; +NP = Zugabe von  $75\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  und  $5\mu\text{M}$  bzw.  $20\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  im Verhältnis 15:1 bzw. 4:1

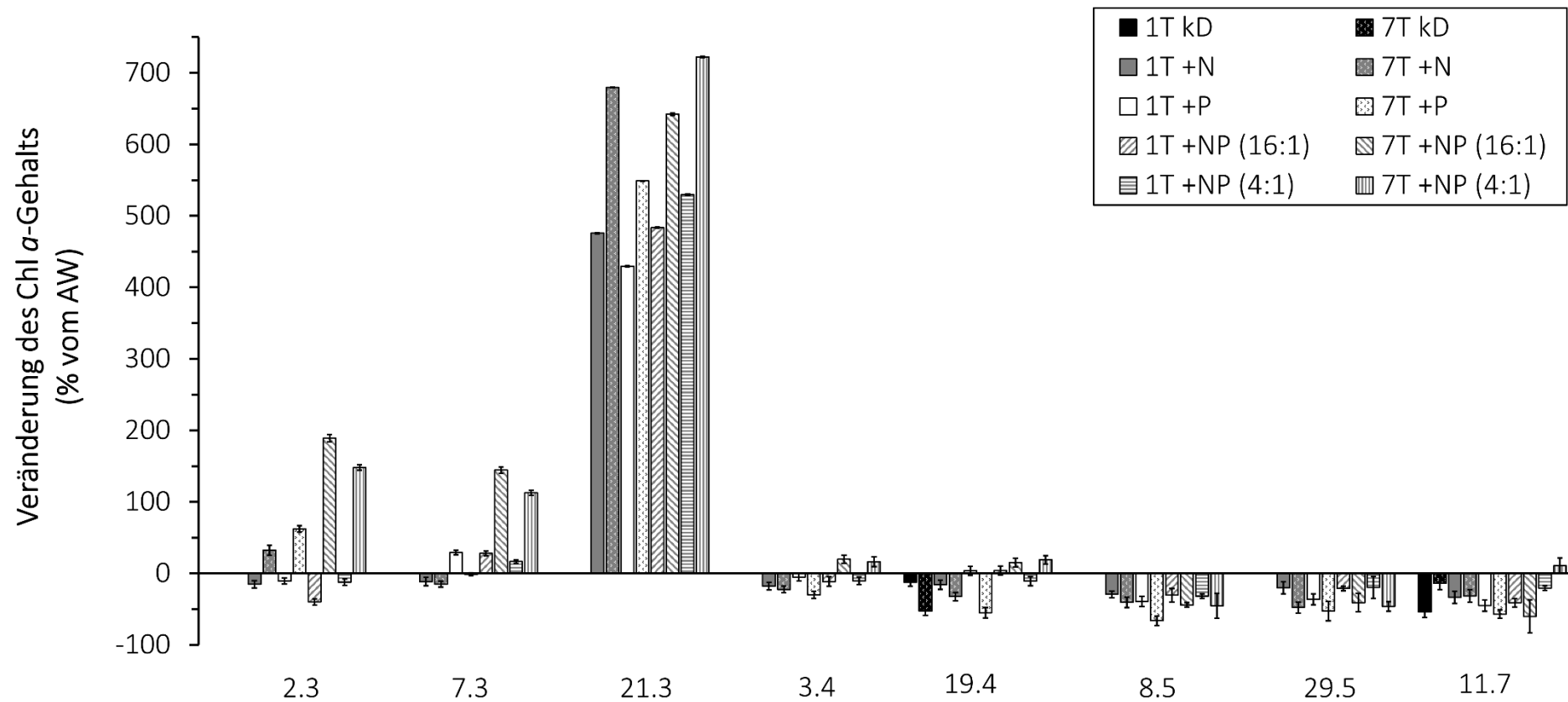


Abb. A24: Die Veränderung des Chlorophyll *a*-Gehalts (Chl *a*-Gehalt) in natürlichen Zingster Strom-Proben (Frühjahr bis Sommer 2017) nach der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen, angegeben in Prozent vom Ausgangswert (AW) nach 24 Stunden (1T) und nach sieben Tagen (7T); kN = keine Nährstoffzugabe; +N = Zugabe von 75  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$ ; +P = Zugabe von 5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; +NP = Zugabe von 75  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  und 5  $\mu\text{M}$  bzw. 20  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  im N:P-Verhältnis von 15:1 bzw. 4:1

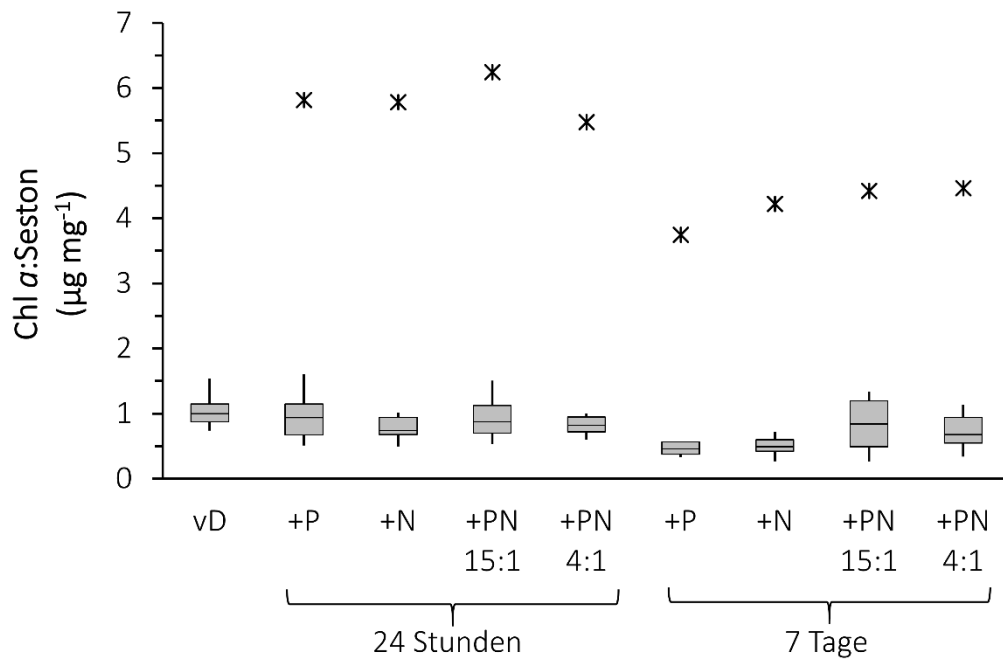


Abb. A25: Die Veränderung des Chlorophyll *a* zu Seston-Verhältnisses (Chl *a*:Seston;  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ) in natürlichen Zingster Strom-Proben vor und nach der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen; Nach 24 Stunden und nach sieben Tage; vN = vor Nährstoffzugabe; +N = Zugabe von  $75\mu\text{M KNO}_3$ ; +P = Zugabe von  $5\mu\text{M Na}_2\text{HPO}_4$ ; +NP = Zugabe von  $75\mu\text{M KNO}_3$  und  $5\mu\text{M}$  bzw.  $20\mu\text{M Na}_2\text{HPO}_4$  im N:P-Verhältnis von 15:1 bzw. 4:1; Dargestellt in Box-Whiskers-Plots; Box = unteres Quartil, Median und oberes Quartil; Whiskers = maximal  $1,5 \times$  des Interquartilsabstandes oder letzter Wert der in diesen Bereich fällt; Sternchen markieren Ausreißer

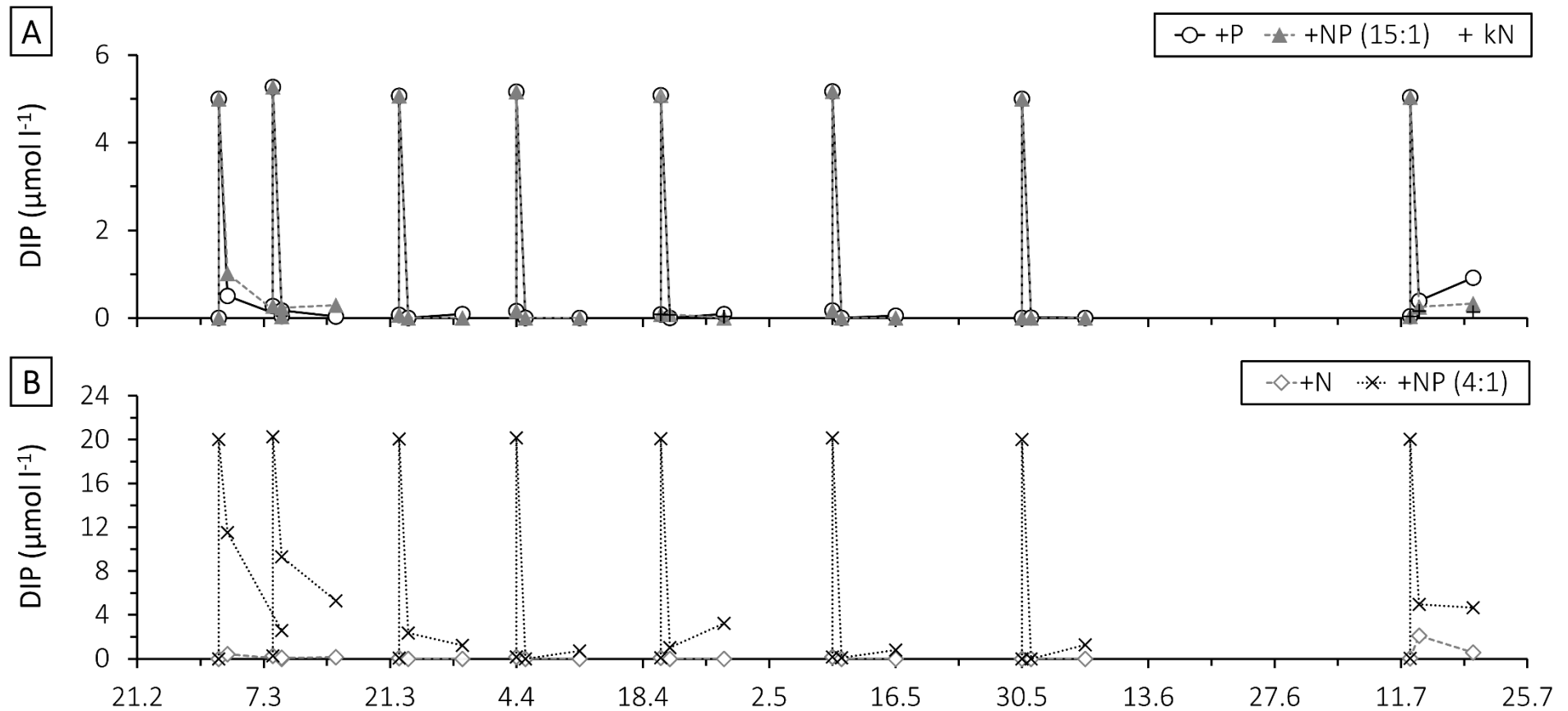


Abb. A26: Die Entwicklung des gelösten anorganischen Phosphorgehalts (DIP-Gehalt,  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) in natürlichen Zingster Strom-Proben (Frühjahr bis Sommer 2017) nach der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen; kN = keine Nährstoffzugabe; +N = Zugabe von  $75\mu\text{M KNO}_3$ ; +P = Zugabe von  $5\mu\text{M Na}_2\text{HPO}_4$ ; +NP = Zugabe von  $75\mu\text{M KNO}_3$  und  $5\mu\text{M}$  bzw.  $20\mu\text{M Na}_2\text{HPO}_4$  im N:P-Verhältnis von 15:1 bzw. 4:1

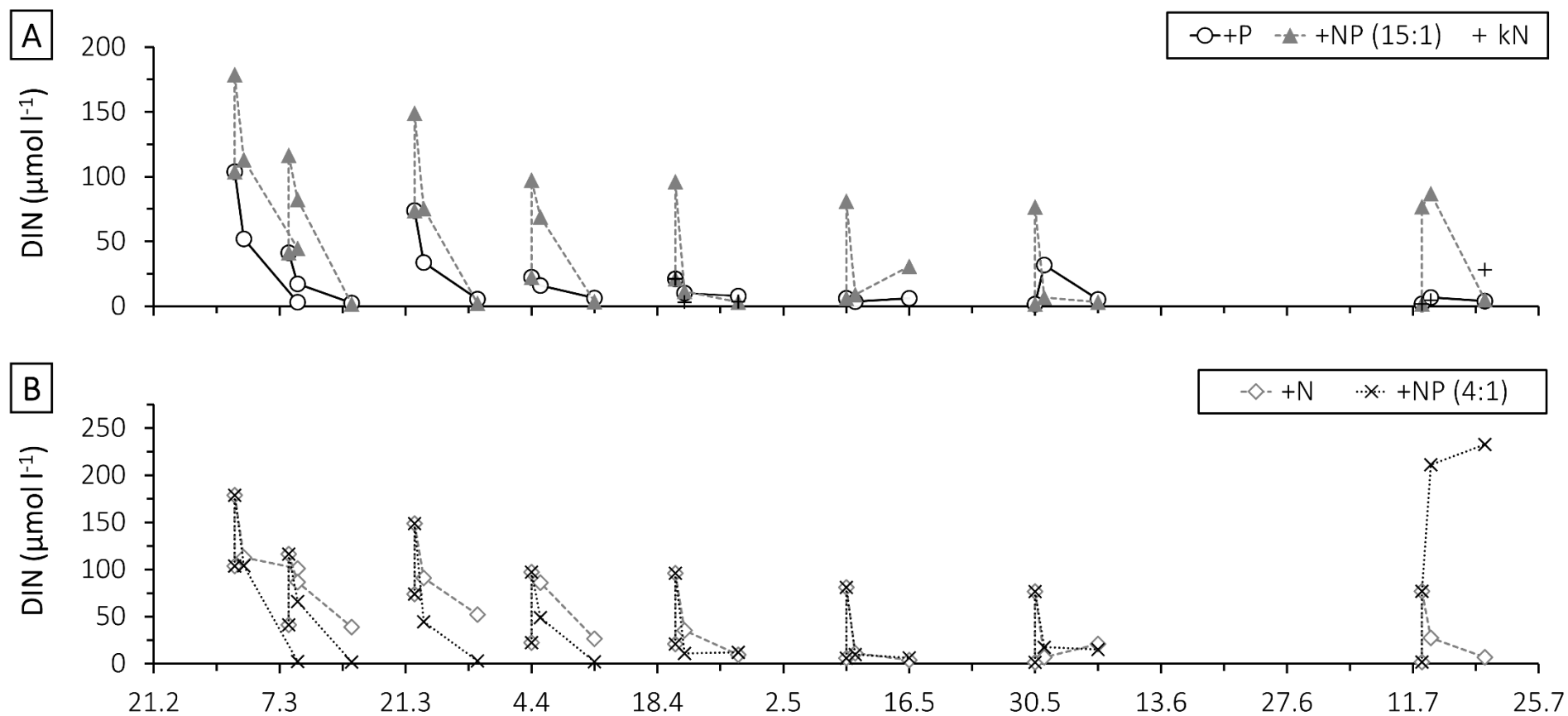


Abb. A27: Die Entwicklung des gelösten anorganischen Stickstoffgehalts (DIN-Gehalt,  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) in natürlichen Zingster Strom-Proben (Frühjahr bis Sommer 2017) nach der Zugabe verschiedener Nährstoffkonzentrationen; kN = keine Nährstoffzugabe; +N = Zugabe von  $75\mu\text{M KNO}_3$ ; +P = Zugabe von  $5\mu\text{M Na}_2\text{HPO}_4$ ; +NP = Zugabe von  $75\mu\text{M KNO}_3$  und  $5\mu\text{M}$  bzw.  $20\mu\text{M Na}_2\text{HPO}_4$  im N:P-Verhältnis von 15:1 bzw. 4:1

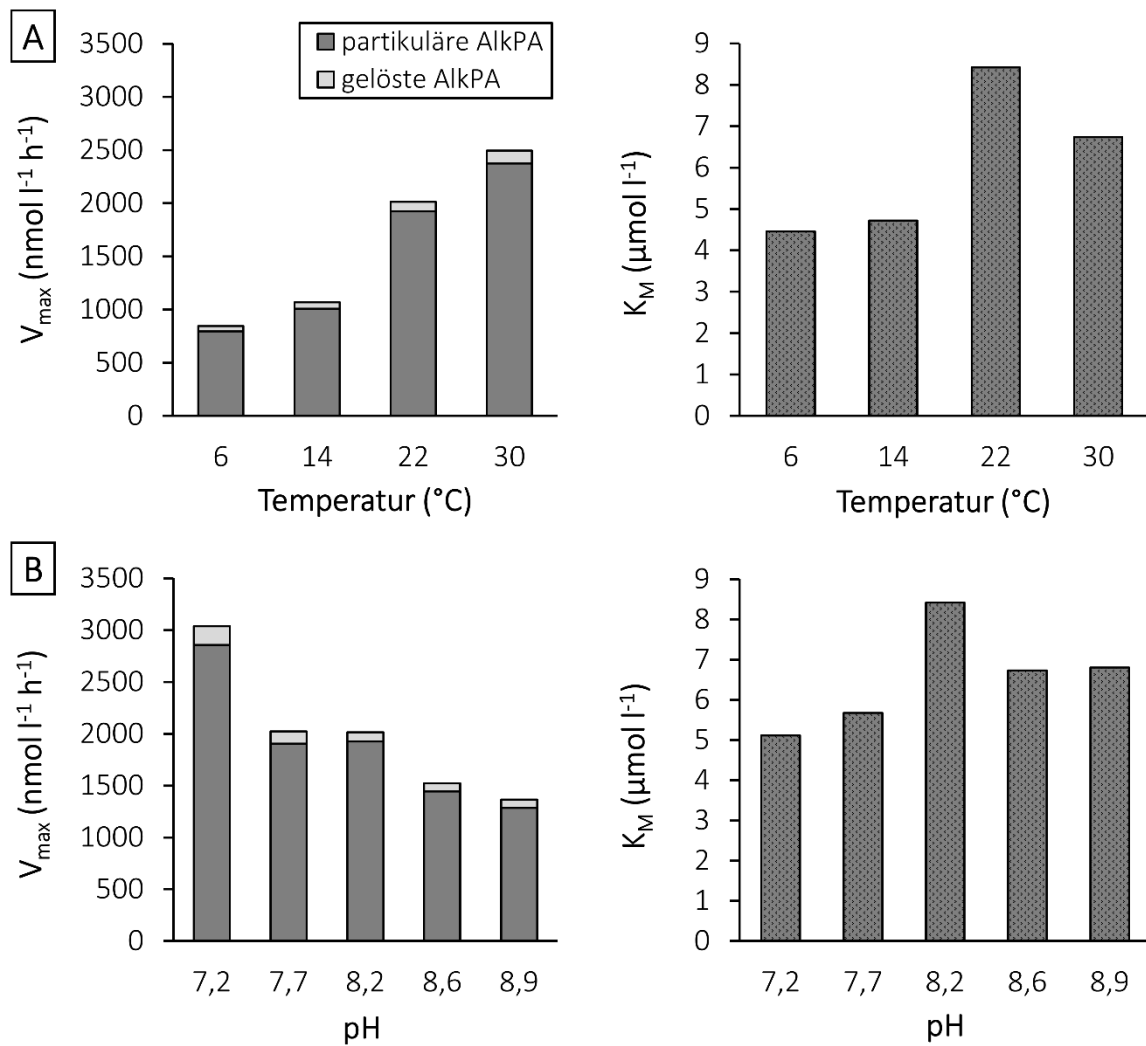


Abb. A28: Die Veränderung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ; nmol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), unterteilt in den gelösten und partikulären Anteil, und der Michaeliskonstante ( $K_M$ ;  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) der alkalinen Phosphataseaktivität mit einer Änderung der a) Temperatur und b) des pH-Wertes; Zingster Strom Planktonprobe vom 24.02.2016



Tabelle A1: Die verschiedenen Indikatorparameter zur Identifizierung von Mangelsituationen für die Nährstoffe Phosphor und Stickstoff

Indikator	Nährstoff	Kein Mangel	Mittlere Limitation	Starke Limitation	Quelle
AlkPA/POM nmol mg <sup>-1</sup> POM h <sup>-1</sup>	P	< 24	48 – 125	> 125	Gage und Gorham 1985 <sup>1</sup>
PP:POM μmol PP mg <sup>-1</sup> POM	P	> 0,32	0,14 – 0,26	< 0,14	
AlkPA/POM nmol mg <sup>-1</sup> POM h <sup>-1</sup>	P	< 12	33 – 42	> 75	Pettersson 1980 <sup>2</sup>
Partik. AlkPA/POM nmol mg <sup>-1</sup> POM h <sup>-1</sup>	P	< 20	20 – 100	> 100	Healey und Hendzel 1979a <sup>3</sup>
Partik. AlkPA/Chl <i>a</i> nmol μg <sup>-1</sup> Chl <i>a</i> h <sup>-1</sup>	P	< 3	3 – 5	> 5	
Partik. AlkPA/PP nmol μg <sup>-1</sup> PP h <sup>-1</sup>	P	< 2	2 – 10	> 10	
Partik. AlkPA/POC nmol mg <sup>-1</sup> POC h <sup>-1</sup>	P	< 4000		> 4000	Healey und Hendzel 1979b <sup>4</sup>
PN:PP	P	< 22	> 22		Healey und Hendzel 1980
POC:PP	P	< 129	129 – 258	> 258	
POC:PN	N	< 8,3	8,3 – 14,6	> 14,6	

AlkPA = alkaline Phosphataseaktivität; Chl *a* = Chlorophyll *a*; N = Stickstoff; Partik. AlkPA = partikuläre alkaline Phosphataseaktivität; P = Phosphor; PN = partikulärer Stickstoff; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff; POM = partikuläres organisches Material; PP = partikulärer Phosphor

Messbedingungen:

<sup>1</sup> *p*-Nitrophenolphosphat; pH 8,6; 15°C

<sup>2</sup> 4-Methylumbelliferyl-Phosphat

<sup>3</sup> *o*-Methylfluorescein-Phosphat; pH 8,5; 35°C

<sup>4</sup> *p*-Nitrophenolphosphat; pH 7,5; 35°C

Tabelle A2: Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Nährstoffkonzentrationen und die Enzymaktivitäten

	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
DIP ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	0,05	0,19
TP und DP ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	0,07	0,22
Ammonium ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	0,06	0,19
Nitrit ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	0,02	0,07
Nitrat ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	0,09	0,29
AlkPA ( $\mu\text{mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0,007	0,02
PepA ( $\mu\text{mol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0,05	0,15

AlkPA = alkaline Phosphataseaktivität; DIP = gelöster anorganischer Phosphor, DP = gelöster Phosphor, TP = Gesamtphosphor, PepA = Aminopeptidaseaktivität

Tabelle A3: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen verschiedenen Biomasseparametern an den drei untersuchten Standorten;  $r_s$  = Korrelationskoeffizient;  $p$  = Signifikanzniveau;  $n$  = Probenanzahl; signifikante Korrelationen sind mit Sternchen markiert: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

			Seston (mg l <sup>-1</sup> )	POM (mg l <sup>-1</sup> )	POC (mg l <sup>-1</sup> )	PN (mg l <sup>-1</sup> )	PP (μmol l <sup>-1</sup> )	Chl <i>a</i> (μg l <sup>-1</sup> )
Ostseeküste	Chl <i>a</i> (μg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,397	0,276	0,358	0,382	-0,253	
		$p$	0,115	0,300	0,276	0,276	0,345	
		$n$	17	16	10	10	16	
	Bakterienabundanz (10 <sup>6</sup> Zellen ml <sup>-1</sup> )	$r_s$	-0,109	0,050	0,167	0,283	-0,121	0,256
		$p$	0,688	0,854	0,668	0,460	0,656	0,339
		$n$	16	16	9	9	16	16
Warnow	Chl <i>a</i> (μg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,798***	0,841***	0,600	0,673*	0,721**	
		$p$	0,000	0,000	0,067	0,033	0,001	
		$n$	18	17	10	10	17	
	Bakterienabundanz (10 <sup>6</sup> Zellen ml <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,292	0,439	-0,050	-0,117	0,480	0,571*
		$p$	0,256	0,078	0,898	0,765	0,051	0,017
		$n$	17	17	9	9	17	17
Zingster Strom	Chl <i>a</i> (μg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,701***	0,636*	0,755***	0,826***	0,718**	
		$p$	0,000	0,035	0,000	0,000	0,002	
		$n$	25	11	17	17	16	
	Bakterienabundanz (10 <sup>6</sup> Zellen ml <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,493*	0,509	0,767*	0,667	0,465	0,478
		$p$	0,045	0,110	0,016	0,050	0,070	0,052
		$n$	17	11	9	9	16	17

Chl *a* = Chlorophyll *a*; PN = partikulärer Stickstoff; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff; POM = partikuläres organisches Material; PP = partikulärer Phosphor

Tabelle A4: Ergebnisse des Kruskal-Wallis Test bei unabhängigen Stichproben zum Testen von Unterschieden in der alkalinen Phosphataseaktivität und Aminopeptidaseaktivität zwischen den drei untersuchten Gewässern

Testvariable	Gruppenvariable	Test-statistik	Standard-fehler	Standard-teststatistik	Signifikanz
Gesamt-AlkPA (unnormiert)	Ostsee zu Warnow	-17,500	5,906	-2,963	0,003**
	Ostsee zu Zingster-Strom	-39,000	5,490	-7,104	0,000***
	Warnow zu Zingster Strom	-21,500	5,399	-3,983	0,000***
Partikuläre AlkPA/PP	Ostsee zu Warnow	-5,882	4,977	-1,182	0,237
	Ostsee zu Zingster-Strom	-27,437	5,052	-5,431	0,000***
	Warnow zu Zingster Strom	-21,555	4,977	-4,331	0,000***
K <sub>M</sub> der Gesamt-AlkPA	Ostsee zu Warnow	-16,190	5,906	-2,741	0,006*
	Ostsee zu Zingster-Strom	-19,332	5,490	-3,521	0,000***
	Warnow zu Zingster Strom	-3,142	5,399	-0,582	0,561
Gesamt-PepA (unnormiert)	Ostsee zu Warnow	-13,080	5,906	-2,215	0,027*
	Ostsee zu Zingster-Strom	-36,041	5,490	-6,565	0,000***
	Warnow zu Zingster Strom	-22,961	5,398	-4,253	0,000***
Partikuläre PepA/Bakterienabundanz	Ostsee zu Warnow	-16,471	5,078	-3,244	0,001**
	Ostsee zu Zingster-Strom	-26,176	5,078	-5,155	0,000***
	Warnow zu Zingster Strom	-9,706	5,000	-1,941	0,052

AlkPA = alkaline Phosphataseaktivität; K<sub>M</sub> = Michaeliskonstante; PepA = Aminopeptidaseaktivität; PP = partikulärer Phosphor

Tabelle A5: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität und verschiedenen Biomasseparametern an den drei untersuchten Standorten;  $r_s$  = Korrelationskoeffizient;  $p$  = Signifikanzniveau;  $n$  = Probenanzahl; signifikante Korrelationen sind mit Sternchen markiert: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

		Partik. AlkPA (nmol l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		
		Ostseeküste	Warnow	Zingster Strom
Chl <i>a</i> (µg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,174	0,399	0,552**
	$p$	0,504	0,101	0,008
	$n$	17	18	22
Bakterienabundanz (10 <sup>6</sup> Zellen ml <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,324	0,309	0,355
	$p$	0,222	0,228	0,162
	$n$	16	17	17
Seston (mg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,451	0,595**	0,433*
	$p$	0,069	0,009	0,044
	$n$	17	18	22
POM (mg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,535*	0,529*	0,645*
	$p$	0,033	0,029	0,032
	$n$	16	17	11
POC (mg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	-0,188	0,491	0,481
	$p$	0,603	0,150	0,081
	$n$	10	10	14
Partik. PepA (nmol l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,304	0,509*	0,586**
	$p$	0,236	0,031	0,004
	$n$	17	18	22

Chl *a* = Chlorophyll *a*; Partik. AlkPA = partikuläre alkaline Phosphataseaktivität; Partik. PepA = partikuläre Aminopeptidaseaktivität; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff; POM = partikuläres organisches Material

Tabelle A6: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären Aminopeptidaseaktivität und verschiedenen Biomasseparametern an den drei untersuchten Standorten;  $r_s$  = Korrelationskoeffizient;  $p$  = Signifikanzniveau;  $n$  = Probenanzahl; signifikante Korrelationen sind mit Sternchen markiert: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

		Partik. PepA (nmol l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		
		Ostseeküste	Warnow	Zingster Strom
Chl <i>a</i> (µg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	-0,110	0,719**	0,458*
	$p$	0,673	0,001	0,021
	$n$	17	18	25
Bakterienabundanz (10 <sup>6</sup> Zellen ml <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,356	0,194	0,208
	$p$	0,176	0,456	0,422
	$n$	16	17	17
Seston (mg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	-0,127	0,849***	0,456*
	$p$	0,626	0,000	0,022
	$n$	17	18	25
POM (mg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,029	0,784***	0,645*
	$p$	0,914	0,000	0,032
	$n$	16	17	11
POC (mg l <sup>-1</sup> )	$r_s$	0,139	0,867**	0,618**
	$p$	0,701	0,001	0,008
	$n$	10	10	17

Chl *a* = Chlorophyll *a*; Partik. PepA = partikuläre Aminopeptidaseaktivität; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff; POM = partikuläres organisches Material

Tabelle A7: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität, unterschiedlich normiert, und verschiedenen Phosphorlimitationsindikatoren am Standort Ostsee;  $r_s$  Korrelationskoeffizient;  $p$  Signifikanzniveau;  $n$  Probenanzahl; signifikante Korrelationen \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

		Partik. AlkPA normiert über						K <sub>M</sub> der partik. AlkPA
		Chl <i>a</i>	POM	POC	PP	Partik. PepA	Bakterien-abundanz	
DIN:DIP	$r_s$	0,206	0,615*	0,333	0,044	-0,316	-0,176	0,259
	$p$	0,428	0,011	0,347	0,871	0,202	0,513	0,333
	$n$	17	16	10	16	17	16	16
PN:PP	$r_s$	-0,483	-0,483	-0,333	0,683*	0,250	-0,567	-0,500
	$p$	0,187	0,187	0,381	0,042	0,516	0,112	0,170
	$n$	9	9	9	9	9	9	9
POC:PP	$r_s$	-0,417	-0,650	-0,517	0,600	-0,033	-0,467	-0,317
	$p$	0,265	0,058	0,154	0,088	0,932	0,205	0,406
	$n$	9	9	9	9	9	9	9
PP:POM	$r_s$	0,050	0,603*	0,533	-0,735**	-0,353	-0,282	-0,309
	$p$	0,854	0,013	0,139	0,001	0,180	0,289	0,244
	$n$	16	16	9	16	16	16	16
DIP	$r_s$	-0,414	-0,639**	-0,772**	-0,034	0,335	0,209	-0,233
	$p$	0,099	0,008	0,009	0,901	0,188	0,438	0,384
	$n$	17	16	10	16	17	16	16
DOP	$r_s$	0,078	0,084	0,150	0,193	-0,299	0,000	0,313
	$p$	0,774	0,757	0,700	0,474	0,261	1,000	0,237
	$n$	16	16	9	16	16	16	16
K <sub>M</sub> der partik. AlkPA	$r_s$	0,253	0,147	0,000	0,503*	-0,159	0,468	
	$p$	0,345	0,587	1,000	0,047	0,557	0,068	-
	$n$	16	16	9	16	16	16	

Chl *a* = Chlorophyll *a*; DIN = gelöster anorganischer Stickstoff; DIP = gelöster anorganischer Phosphor; DOP = gelöster organischer Phosphor; K<sub>M</sub> = Michaeliskonstante; Partik. AlkPA = partikuläre alkaline Phosphataseaktivität; Partik. PepA = partikuläre Amino-peptidaseaktivität; PN = partikulärer Stickstoff; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff; POM = partikuläres organisches Material; PP = partikulärer Phosphor

Tabelle A8: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität, unterschiedlich normiert, und verschiedenen Phosphorlimitationsindikatoren am Standort Warnow;  $r_s$  Korrelationskoeffizient;  $p$  Signifikanzniveau;  $n$  Probenanzahl; signifikante Korrelationen \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

		Partik. AlkPA normiert über						$K_M$ der partik. AlkPA
		Chl <i>a</i>	POM	POC	PP	Partik. PepA	Bakterien-abundanz	
DIN:DIP	$r_s$	0,546*	0,463	-0,103	0,061	0,061	0,632**	-0,730**
	$p$	0,019	0,061	0,777	0,810	0,810	0,006	0,001
	$n$	18	17	10	18	18	17	18
PN:PP	$r_s$	-0,150	-0,100	-0,250	-0,450	-0,450	-0,267	-0,550
	$p$	0,700	0,798	0,516	0,224	0,224	0,488	0,125
	$n$	9	9	9	9	9	9	9
POC:PP	$r_s$	-0,050	-0,083	-0,200	-0,350	-0,350	0,050	-0,650
	$p$	0,898	0,831	0,606	0,356	0,356	0,898	0,058
	$n$	9	9	9	9	9	9	9
PP:POM	$r_s$	0,240	0,350	-0,100	0,267	0,267	-0,007	0,304
	$p$	0,353	0,168	0,798	0,300	0,300	0,978	0,236
	$n$	17	17	9	17	17	17	17
DIP	$r_s$	-0,269	-0,142	-0,067	0,037	0,037	-0,388	0,475*
	$p$	0,280	0,587	0,854	0,883	0,883	0,124	0,047
	$n$	18	17	10	18	18	17	18
DOP	$r_s$	-0,230	-0,277	0,083	-0,228	-0,299	-0,289	0,179
	$p$	0,374	0,282	0,831	0,379	0,244	0,260	0,492
	$n$	17	17	10	17	17	17	17
$K_M$ der partik. AlkPA	$r_s$	-0,298	-0,096	0,127	-0,051	0,199	-0,645**	
	$p$	0,229	0,715	0,726	0,844	0,428	0,005	-
	$n$	18	17	10	17	18	17	

Chl *a* = Chlorophyll *a*; DIN = gelöster anorganischer Stickstoff; DIP = gelöster anorganischer Phosphor; DOP = gelöster organischer Phosphor;  $K_M$  = Michaeliskonstante; Partik. AlkPA = partikuläre alkaline Phosphataseaktivität; Partik. PepA = partikuläre Amino-peptidaseaktivität; PN = partikulärer Stickstoff; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff; POM = partikuläres organisches Material; PP = partikulärer Phosphor



Tabelle A9: Spearman-Rangkorrelationsanalyse zwischen der partikulären alkalinen Phosphataseaktivität, unterschiedlich normiert, und verschiedenen Phosphorlimitationsindikatoren am Standort Zingster Strom;  $r_s$  Korrelationskoeffizient;  $p$  Signifikanzniveau;  $n$  Probenanzahl; signifikante Korrelationen \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

		Partik. AlkPA normiert über						K <sub>M</sub> der partik. AlkPA
		Chl <i>a</i>	POM	POC	PP	Partik. PepA	Bakterien-abundanz	
DIN:DIP	$r_s$	-0,132	-0,527	-0,240	0,003	0,188	0,248	0,385
	$p$	0,613	0,096	0,409	0,991	0,402	0,338	0,127
	$n$	17	11	14	16	22	17	17
PN:PP	$r_s$	0,567	0,607	0,617	0,700*	0,817**	0,733*	0,667*
	$p$	0,112	0,148	0,077	0,036	0,007	0,025	0,050
	$n$	9	7	9	9	9	9	9
POC:PP	$r_s$	0,767*	0,714	0,717*	0,783*	0,850**	0,650	0,483
	$p$	0,016	0,071	0,030	0,013	0,004	0,058	0,187
	$n$	9	7	9	9	9	9	9
PP:POM	$r_s$	-0,394	-0,236	-0,643	-0,636*	-0,200	0,152	0,200
	$p$	0,260	0,511	0,119	0,48	0,580	0,676	0,580
	$n$	10	10	7	10	10	10	10
DIP	$r_s$	-0,090	0,277	0,105	-0,085	-0,046	0,033	0,083
	$p$	0,731	0,410	0,718	0,756	0,838	0,900	0,753
	$n$	17	11	14	16	22	17	17
DOP	$r_s$	-0,441	-0,030	0,200	-0,059	-0,268	-0,329	-0,321
	$p$	0,087	0,934	0,606	0,829	0,316	0,213	0,226
	$n$	16	10	9	16	16	16	16
K <sub>M</sub> der partik. AlkPA	$r_s$	0,385	0,300	0,333	0,376	0,706**	0,583*	
	$p$	0,127	0,370	0,381	0,151	0,002	0,014	-
	$n$	17	11	9	16	17	17	

Chl *a* = Chlorophyll *a*; DIN = gelöster anorganischer Stickstoff; DIP = gelöster anorganischer Phosphor; DOP = gelöster organischer Phosphor; K<sub>M</sub> = Michaeliskonstante; Partik. AlkPA = partikuläre alkaline Phosphataseaktivität; Partik. PepA = partikuläre Amino-peptidaseaktivität; PN = partikulärer Stickstoff; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff; POM = partikuläres organisches Material; PP = partikulärer Phosphor

Tabelle A10: Ergebnisse des T-Test bei gepaarten Stichproben zum Testen von Unterschieden in der Änderung der alkalinen Phosphataseaktivität nach 24 Stunden und sieben Tagen zwischen den Nährstoffbehandlungen

Testvariable	Gruppenvariable	T-Wert	Freiheitsgrade	Signifikanz (2-seitig)
AlkPA/POC 24 Stunden nach Nährstoffzugabe	N zu P	-6,441	7	0,000***
	N zu NP 15:1	5,236	7	0,001**
	N zu NP 4:1	4,414	7	0,003**
	P zu NP 15:1	-2,139	7	0,070
	P zu NP 4:1	0,137	7	0,895
	NP 15:1 zu NP 4:1	2,431	7	0,045*
AlkPA/POC 7 Tage nach Nährstoffzugabe	N zu P	7,246	7	0,000***
	N zu NP 15:1	7,235	7	0,000***
	N zu NP 4:1	7,477	7	0,000***
	P zu NP 15:1	-0,607	7	0,563
	P zu NP 4:1	3,643	7	0,008*
	NP 15:1 zu NP 4:1	2,802	7	0,026*
AlkPA/PepA 24 Stunden nach Nährstoffzugabe	N zu P	7,376	7	0,000***
	N zu NP 15:1	6,217	7	0,000***
	N zu NP 4:1	5,869	7	0,001**
	P zu NP 15:1	-4,803	7	0,002**
	P zu NP 4:1	-0,546	7	0,602
	NP 15:1 zu NP 4:1	2,168	7	0,067
AlkPA/PepA 7 Tage nach Nährstoffzugabe	N zu P	10,279	7	0,000***
	N zu NP 15:1	6,926	7	0,000***
	N zu NP 4:1	8,299	7	0,000***
	P zu NP 15:1	-0,427	7	0,682
	P zu NP 4:1	2,487	7	0,042*
	NP 15:1 zu NP 4:1	2,425	7	0,046*

AlkPA = alkalinen Phosphataseaktivität; N = Stickstoff; P = Phosphor; PepA = Aminopeptidaseaktivität; POC = partikulärer organischer Kohlenstoff



## Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mit ihrer Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein besonderer Dank gilt allen voran meinem Betreuer Prof. Dr. Ulf Karsten. Zum einen für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Unterstützung in fachlichen und praktischen Fragestellungen, aber insbesondere auch dafür, dass er mich in der letzten schwierigen Phase sehr unterstützt hat. Ein besonderer Dank geht auch an meine Betreuerin PD. Dr. Rhena Schumann, die mir bei fachlichen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich habe von Ihr sehr viel gelernt und die schönen Zeiten auf der Biologischen Station Zingst werden mir immer in Erinnerung bleiben. Ein großer Dank geht auch an meine Betreuerin PD. Dr. Christel Baum, die mich in die fremde Welt der Bodenkunde eingeführt hat und an meine Betreuerin Dr. Monika Nausch, für ihren fachlichen Rat und eine hilfreiche dritte Meinung. Ein großer Dank geht an die Leibniz-Gemeinschaft, die mein Forschungsprojekt im Rahmen des Leibniz-WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock finanziert hat. Ich danke der Graduiertenschule des Leibniz-WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock und der Graduiertenakademie der Universität Rostock für die Möglichkeit zahlreiche Weiterbildungskurse zu besuchen. Ich danke den Koordinatorinnen des P-Campus, Dr. Inga Krämer und Dr. Dana Zimmer, für ihr offenes Ohr bei Fragen und Sorgen und allen Mitgliedern des P-Campus für die zahlreichen anregenden fachlichen Diskussionen. Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Angewandte Ökologie und Phykologie“ für die tatkräftige und mentale Unterstützung, für die Einweisungen in Geräte im Labor sowie für all die wertvollen Hinweise und Anregungen. Ein besonderes Dankeschön geht dabei an Juliane Müller und Dagmar Heinrich, die guten Seelen der Arbeitsgruppe, und an Rita Wulff und Volker Reiff für die Unterstützung bei Probenahmen und Probenmessungen. Ich danke herzlich meiner ehemaligen Bürokollegin und Freundin Dr. Julia Regnery, die mir in den schwersten Momenten zur Seite stand, die mich bei vielen Probenahmen unterstützt hat und mir die beste Freundin ist, die man sich wünschen kann. Ein lieber Dank geht an meine ehemaligen Kollegen Dr. Angelika Graiff, Dr. Maximilian Berthold, Dr. Heike Link, Dr. Martin Albrecht und Dr. Karin Glaser für ihr stets offenes Ohr bei fachlichen Fragen. Ich danke M.A. Joachim Dörr herzlich für das ausdauernde Korrekturlesen meiner Arbeit. Schlussendlich möchte ich meiner Familie danken. Vielen Dank, dass ihr meine Träume immer unterstützt und mich gefördert habt, wo immer ihr konntet. Ein besonderer Dank geht an meinen Freund Christian, der mir das Öfteren den Rücken freigehalten hat und an mein wundervolles Kind Moritz, für seine langen Mittagsschläfchen, während denen ich diese Dissertation fertig geschrieben habe.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden keine anderen Quellen genutzt als jene, die im Literaturverzeichnis angeführt sind. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ferner sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Ich versichere, nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen zu haben. Zudem hat keine Person von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion vorgelegt. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Rostock, den 14.01.2021

# Lebenslauf

Sept. 1991 – Jun. 2000	Grund- und Hauptschule Haueneberstein, Baden-Baden Abschluss: Hauptschulabschluss
Sept. 2000 – Jun. 2002	Wirtschaftsschule – Robert-Schuman-Schule, Baden-Baden Abschluss: Fachschulreife
Sept. 2002 – Jul. 2005	Biotechnologisches Gymnasium – Bertha-von-Suttner-Schule, Ettlingen; Abschluss: allgemeine Hochschulreife
Aug. 2005 – Auf. 2006	Work and Travel in Australien
Okt. 2006 – Jul. 2008	Biologie-Diplomstudium – Universität Karlsruhe Abschluss: Vordiplom
Okt. 2008 – Apr. 2012	Biologie-Diplomstudium – Universität Rostock Abschluss: Diplom Hauptfach: Meeresbiologie Nebenfächer: Zoologie, Fischereibiologie und Meereschemie Diplomarbeit durchgeführt am GEOMAR   Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Thema: Der wechselseitige Einfluss von Ozeanversauerung und Nahrungsbedingungen auf die Seepocke <i>Amphibalanus improvisus</i>
Jun. 2012 – Mrz. 2013	Work and Travel in Neuseeland
Apr. 2013 – Sept. 2013	Tauchguide – Liamis Dive Centre, Kos, Griechenland
Dez. 2013 – Jun. 2018	Wissenschaftliche Mitarbeiterin – Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Arbeitsgruppe Angewandte Ökologie & Phykologie Forschungsthemen: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anpassungen des Lipidhaushalts polarer benthischer Diatomeen auf langanhaltende Dunkelphasen wie die polare Nacht</li> <li>- Bewertung der alkalinen Phosphataseaktivität als Indikator für den Phosphorstatus in Phytoplanktongemeinschaften</li> <li>- Auswirkungen der Besiedelung von biologischen Bodenkrusten auf die Phosphataseaktivität und Elementstöchiometrie einer Küstendüne</li> </ul>
Apr. 2015 – voraussichtlich Mrz. 2021	Promotionsstudium – Universität Rostock, MNF, Institut für Biowissenschaften Betreuer: Prof. Dr. Ulf Karsten, PD Dr. Rhena Schumann, PD Dr. Christel Baum und Dr. Monika Nausch Thema: Die alkaline Phosphataseaktivität – ein Indikator für den Phosphorstatus in Phytoplanktongemeinschaften? Erfolgreiche Teilnahme an der Graduiertenschule des Leibniz-WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock
Mrz. 2019 – Jul. 2019	Wissenschaftliche Mitarbeiterin – Leibniz-Institut für Ostseeforschung, Leibniz-WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock
Sept. 2019 – Okt. 2020	Elternzeit

## Publikationsliste

- Iris Schaub, Dana Zimmer und Sebastian Strauch (2019) Nachwuchsförderung und Forschung am Leibniz-WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock. Wasser und Abfall, Ausgabe 10
- Ulf Karsten, Iris Schaub, Jana Woelfel, Duygu S. Sevilgen, Carolin Schlie, Burkhard Becker, Angela Wulff, Martin Graeve and Heiko Wagner (2019) Living on cold substrata – new insights and approaches in the study of microphytobenthos ecophysiology and ecology in Kongsfjorden. In *Advances in Polar Ecology – The Ecosystem of Kongsfjorden, Svalbard*. Springer pp. 303-330 (H. Hop & C. Wiencke, eds.)
- Iris Schaub, Christel Baum, Rhena Schumann and Ulf Karsten (2018) Effects of an early successional biological soil crust from a temperate coastal sand dune (NE Germany) on soil elemental stoichiometry and phosphatase activity. *Microbial Ecology*, doi:10.1007/s00248-018-1220-2
- Iris Schaub, Heiko Wagner, Martin Graeve and Ulf Karsten (2017) Effects of prolonged darkness and temperature on the lipid metabolism in the benthic diatom *Navicula perminuta* from the Arctic Adventfjorden, Svalbard. *Polar Biology*, doi:10.1007/s00300-016-2067-y
- Katarzyna Stachura-Suchoples, Neela Enke, Carolin Schlie, Iris Schaub, Regine Jahn, Ulf Karsten (2015) Contribution towards a morphological and molecular taxonomic reference library of benthic marine diatoms from two Arctic fjords on Svalbard (Norway). *Polar Biology*, doi:10.1007/s00300-015-1683-2
- Jana Wölfel, Antje Schoknecht, Iris Schaub, Neela Enke, Rhena Schumann, Ulf Karsten (2014) Growth and photosynthesis characteristics of three benthic diatoms from the brackish southern Baltic Sea in relation to varying environmental conditions. *Phycologia*, doi: 10.2216/14-019.1
- Christian Pansch, Iris Schaub, Jonathan N. Havenhand and Martin Wahl (2014) Habitat traits and food availability determine the response of marine invertebrates to ocean acidification. *Global Change Biology*, doi:10.1111/gcb.12478
- Iris Schaub (2012) Der wechselseitige Einfluss von Ozeanversauerung und Nahrungsbedingungen auf die Seepocke *Amphibalanus improvisus*. Diplomarbeit, Universität Rostock, 100 Seiten

## Fachvorträge und Posterpräsentationen

- Seminar der Angewandten Ökologie und Phykologie (Juni 2014, Rostock) – Vortrag: Habitat traits and food availability determine the response of marine invertebrates to ocean acidification
- Seminar der Angewandten Ökologie und Phykologie (März 2015, Rostock) – Vortrag: Untersuchungen des Lipidhaushalts polarer benthischer Diatomeen während einer langen Dunkelphase
- Startworkshop Leibniz-WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock (Mai 2015, Rostock) – Vortrag: Phosphatasen – Entwicklung neuer quantitativer Analysemethoden entlang terrestrisch-aquatischer Gradienten
- 6th International Conference on Polar and Alpine Microbiology (September 2015, Budweis, Tschechien) – Poster Präsentation: Effects of prolonged darkness and temperature on the lipid metabolism in the benthic diatom *Navicula perminuta* from the Arctic
- Symposium des Leibniz-WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock (März 2016, Rostock) – Vortrag: Phosphatasen – Development of new quantitative assays along terrestrial-aquatic gradients
- 16. Phykologen Tagung der deutschen botanischen Gesellschaft (März 2016, Leipzig) – Vortrag: Effects of prolonged darkness and temperature on the lipid metabolism in the benthic diatom *Navicula perminuta* from the Arctic
- Seminar der Graduiertenschule Transcoast (Juni 2016, Rostock) – Vortrag: Phosphorus demand in algae communities – Phosphatase activity as a proxy?
- 8th International Phosphorus-Workshop (September 2016, Rostock) – Poster Präsentation: Phosphorus demand in phytoplankton communities – Alkaline phosphatase activity as a proxy?
- Seminar der Angewandten Ökologie und Phykologie (Dezember 2016, Rostock) – Vortrag: Phosphorus demand in phytoplankton communities – Alkaline phosphatase activity as a proxy?
- Symposium des Leibniz-WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock (April 2017, Rostock) – Vortrag: Phosphatasen – Development of new quantitative assays along terrestrial-aquatic gradients
- 11th Baltic Sea Science Congress “Living along gradients: past, present, future” (Juni 2017, Rostock) – Poster Präsentation: Alkaline phosphatase activity in plankton communities of a eutrophic lagoon – Seasonality and origin
- Symposium des Leibniz-WissenschaftsCampus Phosphorforschung Rostock (November 2017, Rostock) – Vortrag: Phosphatasen – Development of new quantitative assays along terrestrial-aquatic gradients
- Seminar der Angewandten Ökologie und Phykologie (Januar 2018, Rostock) – Vortrag: Assessment of the phosphatase activity as phosphorus demand indicator in natural phytoplankton communities